

Vol. 26, No. 3.

November, 1937.

THE JOURNAL
OF
BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARI-YAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY.

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$5.50 per volume.

ÜBER DIE DEPHOSPHORIERUNG DES CASEINS DURCH DIE PHOSPHATASE.

von

RIZO SADAMITSU.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 28. Mai 1937)

Die Dephosphorierung des Caseins durch die Phosphatase studierten zuerst Rimington und Kay (1926). Sie teilten mit, dass die Knochenphosphatase einerseits, während sie gegen das peptische Hydrolysat des Caseins unwirksam war, das durch kurze tryptische Verdauung gebildete Phosphopepton so weit zu spalten vermochte, dass 2/3 vom gesamten Phosphor befreit wurde, und dass die Nierenphosphatase andererseits Abspaltung des gesamten Phosphors aus dem Phosphopepton bewirken konnte. Rimington (1927) hat dann angegeben, dass in dem Phosphopepton 2/3 vom gesamten Phosphor in Monoester-Form, aber das übrige 1/3 in Diester-Form gebunden sei. Diese Annahme beruhte auf der Mitteilung von Martland und Robison (1926), dass die Knochenphosphatase den Monoäthylester der Phosphorsäure leicht aufspaltet, aber auf den durch Nierenphosphatase spaltbaren Diäthylester nur sehr schwach einwirkt.

Dass der gesamte gebundene Phosphor des Caseins als Serinphosphorsäure enthalten ist, wurde zuerst von Lipmann (1933) wahrscheinlich gemacht. Levene (1933) und Schmidt (1934) haben weiter nachgewiesen, dass sich die Serinphosphorsäure im Casein bei ihrem Serinrest mit Glutaminsäure oder Leucin verbindet. Aber dagegen die Frage, ob der Phosphorsäurerest der Serinphosphorsäure im Casein oder auch in dessen proteatischen Hydrolysat überhaupt total in Monoester-Form oder wenigstens partiell noch weiter gebunden wie in Diester-Form oder Pyrophosphorsäureester-Form vorhanden sei, bleibt noch dahin gestellt. Ich wollte diese Frage systematisch untersuchen.

Durch die Untersuchungen in hiesigem Institut ist es nun bekannt geworden, dass die Phosphatase nicht einheitlich ist und darin Phosphomonoesterase, Pyrophosphatase, Phosphodiesterase und Phosphamidase zu unterscheiden sind. Die Phosphomonoesterase befreit Phosphorsäure aus ihrer Verbindung mit 1 Molekül Alkohol, und die Pyrophosphatase zerlegt anorganischen Pyrophosphat in 2 Moleküle Phosphat. Saurer Pyrophosphorsäureester wird durch Pyrophosphatase unter Mitwirkung des Pyrophosphatasenaktivators zuerst in 2 Moleküle Phosphorsäuremonoester aufgespalten, und die weitere Hydrolyse des letzteren in seine Bestandteile wird nun durch die Phosphomonoesterase katalysiert. Der Phosphorsäurediester—worin die Phosphorsäure mit 2 Molekülen Alkohol sich verestert—liefert unter der Wirkung der Phosphodiesterase zuerst je ein Molekül vom Phosphorsäuremonoester und Alkohol, daher ist zur Bildung des anorganischen Phosphats noch weiteres Einwirken der Monoesterase notwendig. Die einzelne Phosphatase ist nun im isolierten Zustand herzustellen. Unter Benutzung dieser Spezifität der Phosphatase habe ich die Verbindungsform der Phosphorsäure im Casein-molekül studiert.

Angesichts der Tatsache, dass die Takadiastase in sich verschiedene Phosphatasen von voller Aktivität enthält, habe ich zuerst dieses Aspergilluspräparat auf Casein und auf dessen peptisches oder peptisch-tryptisches Hydrolysat einwirken gelassen, um zu prüfen, wie die Geschwindigkeit der Dephosphorierung des Caseins von dem vorherigen proteatischen Hydrolysengrad beeinflusst wird.

Aber die Frage, ob die Phosphorsäure im Casein bei der Proteolyse überhaupt ungespalten bleibt, scheint noch nicht klar gelegt worden zu sein. Biffi (1897) hat angegeben, dass bei tryptischer Verdauung des Caseins 27% vom gesamten Phosphor mittels Magnesiamixtur fällbar gemacht wurde. Nach Plimmer und Bayliss (1906) sollte wieder bei der tryptischen Caseinhydrolyse durchschnittlich 35% Phosphor als anorganisches Phosphat abgespalten werden. Rimington und Kay (1926) beobachteten auch, dass bei der Spaltung des Caseins durch Pankreasextrakt in vierzehn Tagen 41%ige Dephosphorierung und noch

beim Mitwirken der Enterokinase sogar die vollständige P-Abspaltung hervorgebracht werden konnte. Ich bin aber jetzt der Meinung, dass sich die von diesen Autoren mitgeteilte tryptische Dephosphorierung einfach auf die Wirkung der in dem gebrauchten Trypsinpräparat oder Pankreasextrakt enthaltenen Phosphatase beziehen muss. Denn ich konnte beweisen, dass sowohl das Pankreasextrakt als auch das Trypsin im Handel tatsächlich phosphatasehaltig sind und dass sie, falls vorher von der Phosphatase durch Adsorptionsverfahren befreit, bei der Verdauung des Caseins oder dessen peptischen Hydrolysats keine anorganische Phosphorsäure zu erzeugen im Stande sind.

Bei dem Wirken des Takaferments auf das Casein oder seine partiellen Hydrolysate ist die Dephosphorierungsgeschwindigkeit am grössten bei dem peptisch-tryptischen Hydrolysat, dem folgt das peptische Hydrolysat und beim Casein ist jene am geringsten.

In dieser Fermentlösung sind ja verschiedene Arten Phosphatase vorhanden, aber die soweit verdünnte Lösung, dass sie wohl noch auf das Glycerophosphat wirksam, aber das Diphenyl-monophosphat nicht mehr zu hydrolysieren im Stande ist, spaltet auch anorganische Phosphorsäure aus dem peptisch-tryptischen Hydrolysat. Diese Tatsache zeigt wenigstens zuerst, dass die Phosphorsäure nicht sämtlich in Diester-Form vorhanden ist. Wenn man aber andererseits berücksichtigt, dass je tiefer das Casein vorher verdaut gewesen ist, desto geschwinder die Dephosphorierung vonstatten geht, so könnte man auch vermuten, dass an jener P-Abspaltung ausser der Wirkung der Phosphatase noch die Protease im Takapräparat in irgendeiner Weise teilnehmen könnte. Dephosphorierung des Caseins selbst ohne Proteolyse muss daher mit der proteasefreien Phosphatase geprüft werden. Um sich die Sache nicht verwirren zu lassen, habe ich in weiteren Versuchen als Substrat das peptisch-tryptische Hydrolysat, das bei vorliegendem Experiment am tiefsten abgebauten Casein, benutzt. Über die Wirkung der Peptidase auf dieses Hydrolysat wird später gesprochen werden.

Da die verschiedenen Phosphatasen in der Taka-Lösung schwer voneinander zu trennen sind, so habe ich mit den nach Asakawa's

Methode gewonnenen Extrakten von Schweineniere und -leber experimentiert. Ich habe damit eine beträchtliche Dephosphorierung bei PH 4 und PH 9 beobachtet. Sie waren also dephosphorierungsfähig, aber enthielten natürlich das gesamte System der Phosphatasen. So habe ich zuerst daraus die in saurem Medium wirksame Phosphomonoesterase bzw. Pyrophosphatase isoliert und je bei PH 4 auf das peptisch-tryptische Hydrolysat des Caseins einwirken gelassen. Beide Fermentlösungen waren aber unwirksam. Weiter habe ich weder bei der Wirkung der Pyrophosphatase + Monoesterase + Pyrophosphatasenaktivators noch bei der Wirkung der Diesterase + Monoesterase eine messbare Dephosphorierung in 24 Stunden beobachtet. Dagegen war die nach Satoh's Methode von Kaninchenlunge isolierte alkalische Monoesterase im Stande, eine ziemlich starke Dephosphorierung des Caseinhydrolysats zu bewirken. Diese alkalische Monoesterase war praktisch pyrophosphatasefrei, kombinierte Einwirkung der alkalischen Monoesterase und Diesterase lieferte keine stärkere P-Abspaltung als die alleinige Monoesteraseeinwirkung. Aus dieser Tatsache kann man vorläufig schliessen, dass die Phosphorsäure im Caseinhydrolysat weder in Diester-Form noch Pyrophosphorsäure-Form verbunden ist.

Angesichts der Angabe von Levene, dass er aus dem Säurehydrolysat des Caseins Serinphosphorsäure isolieren konnte, ist man nun in der Lage anzunehmen, dass die Phosphorsäure des Caseins oder wenigstens seines peptisch-tryptischen Hydrolysats ausschliesslich in Monoester-Form mit Serin oder eventuell noch mit anderen Oxyaminoäuren verbunden ist. Diese Bindung zwischen der Phosphorsäure und den Oxyaminoäuren scheint nach dem obigen Experiment durch die alkalische Monoesterase leicht, aber durch die saure Monoesterase nicht aufspaltbar. Das Verhältnis war aber nicht so einfach. Denn ich konnte einerseits, wie oben erwähnt, Dephosphorierung des peptischtryptischen Caseinhydrolysats durch das saure Phosphatasengemisch beobachten, und andererseits habe ich bei weiterem Experiment beobachtet, dass die dialysierte Lösung der Kaninchenerthrocyten das Caseinhydrolysat bei PH 5.6 deutlich dephosphorierte, während

die nach Kobayashi's Methode aus Trockenhefe extrahierte alkalische Monoesterase gegen dasselbe Substrat unwirksam war.

Diese Ergebnisse lassen zwei Möglichkeiten hinsichtlich der Dephosphorierung des Caseinhydrolysats annehmen. Wenn die gebundene Phosphorsäure im Casein überhaupt durch die Phosphomonoesterase, die bei der Hydrolyse des Glycerophosphats wirksam ist, abgespalten werden kann, so muss dabei gleichzeitiges Mitwirken eines anderen Ferments oder eines Aktivators vorhanden sein. Oder es handelt sich um eine ganz und gar neue Phosphatase.

In dieser Beziehung ist die Wirkung der nach Uzawa's Methode von Reiskleien isolierten Phosphomonoesterase zu bemerken. Diese diesterasefreie Fermentlösung bewirkte deutliche Dephosphorierung des Caseinhydrolysats und Glycerophosphats und bei beiden Substraten zeigte sie die an Prozentsatz beinahe gleiche Hydrolyse. Aber als diese Fermentlösung bei PH 5.6 mit Tonerde behandelt wurde, war die Adsorptionsrestlösung noch imstande das Glycerophosphat aufzuspalten, aber gegen Caseinhydrolysat war sie unwirksam. Ich wollte eine Fermentlösung aus jener Reiskleienlösung isolieren, die im umgekehrten Sinne gegen das Caseinhydrolysat wohl wirksam sei, aber das Glycerophosphat nicht spalten könne. Adsorptionsverfahren unter verschiedenen Bedingungen mit verschiedenen Adsorptionsmitteln war erfolglos. Wir sind also vorläufig der Meinung, dass, wo es keine Monoesterase gibt, die auf das Glycerophosphat wirksam ist, auch keine Dephosphorierung des Caseinhydrolysats vonstatten geht.

Die im obigen Experiment benutzten verschiedenen Phosphatasen waren, auf der Spezifität der Phosphatase beruhend, voneinander isoliert worden, aber ohne Rücksicht darauf zu nehmen, ob jede Phosphataselösung ein zur anderen Klasse gehöriges Ferment, z. B. irgendeine Protease enthalte. Man könnte daher voraussetzen, dass die mit dem Serin oder anderen Oxyaminoäuren veresterte Phosphorsäure eigentlich leicht durch jene Monoesterase abspaltbar ist, aber wenn sich diese Phosphooxyaminoäure weiter an ihrem Aminosäurerest mit anderer Aminosäure peptidisch bindet, dann wird die Dephosphorierung stark erschwert. Es soll

nun geprüft werden, ob die vorherige Einwirkung der Peptidase auf das Caseinhydrolysat seine Dephosphorierung durch die Monoesterase wirklich möglich macht.

Daher habe ich nach Grassmann's Methode aus Hefeauteolysat die Aminopolypeptidase und Dipeptidase gesondert isoliert und jedes Ferment bei PH 8 auf das Caseinhydrolysat einwirken gelassen. Dann wurde die oben erwähnte, an sich gegen das Caseinhydrolysat als unwirksam bewiesene Phosphomonooesterase weiter darauf wirken gelassen. Eine Dephosphorierung war aber nicht zu bemerken. Wenn also die Dephosphorierung des Caseinhydrolysat durch die Monoesterase eigentlich unter dem Mitwirken des anderartigen Ferments geschehen sollte, gehört dieses letzte Ferment ohne Zweifel nicht zur Peptidase. Und damit stimmt die oben erwähnte Tatsache über, dass die dialysierte Lösung der an sich proteasearmen Erythrocyten auch jene Dephosphorierung auszuüben imstande war.

Ob das Serinphosphat durch die Monoesterase selbst oder durch dasselbe Ferment aber von irgendwie aktivierter Form spaltbar oder seine wirkliche Hydrolyse eigentlich einer spezifischen Monoesterase bedürftig sei, ist durch künftige Untersuchungen zu entscheiden. Und ob im Casein selbst die mit dem Serin veresterte Phosphorsäure sämtlich frei in Monoester-Form vorhanden sei oder ob sie noch weiter in Diester-Form oder Pyrophosphorsäure-ester-Form gebunden sei, ist noch zu untersuchen. Das Experiment ist im Gange.

EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Substrat.

Casein (Merck); Phosphorgehalt war 0.75%. Pepsin (Merck) war frei sowohl von anorganischer Phosphorsäure als auch von den verschiedenen Klassen der Phosphatase. Dagegen waren die Trypsinpräparate im Handel P-haltig und besaßen phosphatatische Wirkung. Also bei der tryptischen Verdauung musste das Ferment vorher von der beigemischten Phosphatase befreit werden, was ich im folgender Weise erzielen konnte. 6% Trypsinlösung

wurde mit gleichem Volumen Tonerde bei 37° eine Stunde zeitweise geschüttelt und zentrifugiert, die überstehende Lösung wurde bis zur Freiheit von anorganischem Phosphor gegen destilliertes Wasser dialysiert. Bei der tryptischen Verdauung des Caseins wurde diese Fermentlösung noch 6 fach verdünnt. Bereitung der Hydrolysate des Caseins war wie folgt.

1. Peptisches Hydrolysat des Caseins; 6 g Casein wurden in 100 ccm verdünnter Natronlauge gelöst, dann durch Zusatz von Salzsäure auf PH 1.8 angesäuert und mit 50 ccm von 0.5% Pepsin versetzt. Verdauung wurde im Brutschrank von 37° einige Tage unter zeitweiligem Umschütteln fortgesetzt, während dessen wurde PH der Lösung jeden Tag elektrometrisch gemessen und die Herabsetzung der Azidität durch abermaligen Zusatz von Salzsäure korrigiert. Nach der vollendeten Hydrolyse wurde das Verdauungsgemisch in siedendem Wasserbad 5 Minuten erhitzt. Das endliche Volumen machte ungefähr 190–210 ccm, aber schwankte etwas je nach dem Fall. Gesamt-P-Gehalt wurde an jedem Hydrolysat gemessen.

2. Peptisch-tryptisches Hydrolysat des Caseins; 8 g Casein wurde in 100 ccm verdünnter Natronlauge gelöst, und wie oben, angesäuert, mit Pepsin versetzt. Verdauung dauerte 5 Tage. Nach Beendigung der Hydrolyse wurde die Lösung mit Natronlauge auf PH 8.2 alkalisiert, mit 50 ccm 0.5% Trypsin, das wie oben erwähnt vorbehandelt wurde, versetzt und im Brutschrank von 37° einige Tage stehen gelassen. Gesamtvolumen machte ca. 270–290 ccm. Verschiebung der Azidität wurde zeitweise durch Zusatz von Natronlauge korrigiert. Das so erhaltene Verdauungsgemisch wurde endlich im Wasserbad 5 Minuten erhitzt. Gesamt-P-Gehalt wurde an jedem Hydrolysat gemessen.

II. Fermentlösung:

1. Schweinenieren- und leber-Ferment nach Asakawa (1928).
2. Phosphomonoesterase, die in saurer Reaktion wirksam ist, wurde nach Kurata (1931) aus Schweineleber isoliert.
3. Pyrophosphatase, die in saurer Reaktion wirksam ist,

wurde auch nach Kurata (1931) aus Schweineniere isoliert.

4. Phosphomonoesterase, die in alkalischer Reaktion wirksam ist, wurde nach Satoh (1935) aus Kaninchenlunge isoliert.

5. Pyrophosphatasenaktivator, frei von Pyrophosphatase und Phosphomonoesterase, wurde nach Kurata (1931) aus Schweineleber isoliert.

6. Phosphomonoesterase, die in alkalischer Reaktion wirksam ist, wurde nach Kobayashi (1936) aus Trockenhefe isoliert. 2 g Trockenhefe wurde in 30 ccm Natriumbicarbonat suspendiert, nach 24 stündigem Aufbewahren bei 37° zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert.

7. 0.2%ige Habugiftlösung als Phosphodiesterase.

8. Das Reiskleienferment nach Uzawa (1932).

9. Takaphosphatase, nach Kobayashi (1927) gereinigt.

10. Aminopolypeptidase und Dipeptidase nach Grassmann (1930, 1934).

11. Phosphomonoesterase der Kaninchen-Erythrocyten; Defibriniertes Blut wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit Wasser auf ursprüngliches Volumen gefüllt und gegen destilliertes Wasser bis zur Freiheit von anorganischem Phosphor dialysiert.

III. Anordnung der Fermentversuche:

Versuchstemperatur 37°. Als Pufferlösung dienten $M/2$ Acetat-Essigsäure, $M/10$ Glykokoll-HCl und $M/10$ Glykokoll-Natron. PH wurde gleich nach Anstellung der Versuche elektrometrisch ermittelt. P-Bestimmung wurde bei dem Versuch mit dem Casein oder seinen Hydrolysaten nach Ichihara (1933) ausgeführt, nämlich die abgespaltene Phosphorsäure wurde zuerst durch Magnesiamixtur als Magnesiumammoniumphosphat gefällt und dann der Phosphor kolorimetrisch nach Fiske-Subbarow bestimmt. Bei sonstigen wurde anorganische Phosphorsäure an dem Trichloressigfiltrat nach Fiske-Subbarow bemessen. Die mg-Zahlen in den nachstehenden Tabellen bedeuten das Gewicht des abgespaltenen anorganischen Phosphor in 1 ccm der Versuchslösung.

IV. Ergebnisse.

1. Über die Phosphatase in Trypsin (Merck und Grübler). 3% Trypsinlösung wurde gegen destilliertes Wasser bis zur Freiheit von anorganischem Phosphor dialysiert. Als Substrate dienten *M/100* Natrium Glycerophosphat, *M/200* Natrium Pyrophosphat, *M/100* Diphenylphosphat und *M/200* Diphenylpyrophosphat.

Trypsinlösung	3.0 ccm
Pufferlösung	3.0 "
Substratlösung	4.0 "

pH 8.5	Glycero-phosphat		Pyrophosphat		Diphenyl-phosphat		Diphenyl-pyrophosphat	
	in mg	%	in mg	%	in mg	%	in mg	%
Nach 24 Stdn.								
Von Merck	0.0176	14.2	0.0248	20.1	0	0	0	0
Von Grübler	0.0111	9.2	0.0409	33.0	0	0	0.0045	3.7

Als 6% Trypsin (Merck)-lösung auf oben erwähnte Weise gereinigt wurde, übte die dadurch aufs doppelte verdünnte Lösung die folgende phosphatatische Wirkung aus. Zusammensetzung der Versuchslösung wie 1.

pH 8.8	Glycerophosphat		Pyrophosphat	
	in mg	%	in mg	%
Nach 20 Stdn.	0.0043	3.5	0	0

2. Spaltung des Caseins durch Takadiastase.

Dialysierte 5% Takadiastase wurde gebraucht. 20 stündiger Versuch. Gesamt-P-Gehalt in 1 ccm peptisch-tryptischen Hydrolysats war 0.2025 mg.

Fermentlösung	5.0 ccm
Puffer	5.0 "
Peptisch-tryptisches Hydrolysat	5.0 "

PH	P in mg	%
2	0.0221	33.0
3.4	0.0613	91.0
4	0.0640	95.0
5	0.0637	94.0
5.6	0.0657	98.0
6	0.0612	91.0
7	0.0155	23.0

Bei folgendem Versuch wurde diese 5% Takalösung 10 oder 50 fach verdünnt gebraucht.

3. Vergleichende Hydrolyse des Caseins, des peptischen und peptisch-tryptischen Hydrolysats durch 0.5 und 0.1% Takalösung. Zuerst wurde die Aktivität der verdünnten Takalösungen auf Monophenylphosphat, Diphenylphosphat, Pyrophosphat und Diphenylpyrophosphat geprüft. Konzentration der Substrate war $M/100$. 22 stündiger Versuch.

Fermentlösung	5.0 ccm
Substrat ($M/100$)	5.0 „
Puffer	5.0 „

PH 5.6	0.5% Takalösung		0.1% Takalösung	
	P in mg	%	P in mg	%
Monophenylphosphat	0.107	103.0	0.0715	69.0
Glycerophosphat	0.100	98.0	0.0435	42.0
Pyrophosphat	0.182	88.0	0.0363	17.5
Diphenylphosphat	0.0056	5.4	0	0

Dieselbe Fermentlösung wurde auf Casein und seine Hydrolysate in folgender Weise einwirken gelassen. 22 stündiger Versuch. Die Caseinlösung war 3% Casein in 100 ccm verdünnter Natronlauge. PH der Lösung war ungefähr 9. Zur Anstellung der Versuche mit dem Casein bei verschiedenen PH wurde 5 ccm Lösung tropfenweise mit 10% HCl versetzt, bis sie den gewünsch-

ten PH zeigte, und dann mit Wasser auf 10 ccm gebracht. Dem wurde 5 ccm Fermentlösung hinzugefügt. Mit dem peptisch-trypischen Caseinhydrolysat wurde der Versuch in gleicher Weise ausgeführt. Bei dem Versuch mit dem peptischen Hydrolysat wurde 10% NaOH statt HCl zur Einstellung des PH gebraucht.

Gesamt-P in 1 ccm Substratlösung war bei Casein 0.232 mg, bei dem peptischen Hydrolysat 0.2019 mg und bei dem peptisch-trypischen Hydrolysat 0.2025 mg.

Fermentlösung	5.0 ccm
Substratlösung	5.0 „
Puffer	5.0 „

Nach 22 Stdn.	Peptisch-Tryptisches Hydrolysat			Peptisches Hydrolysat			Casein		
	PH	P in mg	%	PH	P in mg	%	PH	P in mg	%
0.5% Takalösung	2	0	0	2.4	0	0	2.0	0	0
	3	0.008	12.0	3.4	0.0093	13.3	3.2	0.0012	1.5
	4	0.0339	50.0	4.0	0.0161	22.9	4.0	0.0060	7.8
	5.2	0.0481	71.2	5.2	0.0295	42.1	5.0	0.0136	21.1
	5.6	0.0400	59.0	5.7	0.0283	40.3	5.5	0.0212	27.4
	6.2	0.0286	42.0	6.3	0.0148	21.0	6.3	0.0079	10.3
	7	0	0	7.2	0	0	7.1	0	0
0.1% Takalösung	2.0	0	0	2.2	0	0			
	3.1	0	0	3.2	0	0			
	4.0	0.00541	8.3	4.1	0	0			
	5.1	0.0093	13.8	5.0	0.0016	2.3			
	5.6	0.0113	16.9	5.7	0.0027	3.8			
	6.0	0.0090	13.3	6.1	0	0			
	6.9	0	0	7.0	0	0			

4. Spaltung des peptisch-trypischen Hydrolysts durch dialysiertes Schweineniere- oder Schweineleber-Autolysat. 20 stündiger Versuch. Gesamt-P in 1 ccm Caseinhydrolysat war 0.166 mg.

Fermentlösung	4.0 ccm
Caseinhydrolysat	6.0 „
Puffer	6.0 „
Wasser	4.0 „

Ferment	PH	P in mg	%
Nierenferment	3.8	0.0045	9.0
	9.0	0.0159	32.0
Leberferment	3.5	0.0124	25.0
	9.0	0.0047	9.5

5. Prüfung der Aktivität der isolierten Phosphatasen, die in saurer Reaktion wirksam sind.

A. Saure Phosphomonoesterase, die nach Kurata (1931) isoliert wurde.

Fermentlösung	2.0 ccm
M/100 Glycerophosphat od.	
M/100 Pyrophosphat	2.0 „
Puffer	5.0 „
Wasser	1.0 „

PH 4	Glycerophosphat		Pyrophosphat	
	P in mg	%	P in mg	%
nach 25 Stdn.	0.0420	68.0	0.0080	6.7

B. Saure Pyrophosphatase, die nach Kurata (1931) isoliert wurde.

Fermentlösung	2.0 ccm
M/100 Pyrophosphat od.	
M/100 Glycerophosphat	2.0 „
Puffer	5.0 „
Wasser	1.0 „

PH 4	Pyrophosphat		Glycerophosphat	
	P in mg	%	P in mg	%
nach 24 Stdn.	0.124	100	0	0

C. Pyrophosphatasenaktivator, ebenfalls nach Kurata (1931) isoliert.

<i>M</i> /100 Diphenylpyrophosphat	3.0 ccm
Phosphomonoesterase	2.0 „
Pyrophosphatase	2.0 „
Pyrophosphatasenaktivator	2.0 „
Puffer	5.0 „
Wasser	1.0 „

PH 4	Diphenylpyrophosphat	
	P in mg	%
nach 20 Stdn.	0.108	90

D₁. Phosphodiesterase (0.2% Habu-Gift) bei gleichzeitigem Zusammenwirken mit der sauren Phosphomonoesterase.

0.2% Habu-Gift	5.0 ccm
Phosphomonoesterase	5.0 „
<i>M</i> /100 Diphenylphosphat	10.00 „
Puffer	5.0 „

PH 5.6	Diphenylphosphat	
	P in mg	%
nach 20 Stdn.	0.030	24.2

D₂. Phosphodiesterase bei nachherigem Wirken der sauren Monoesterase.

0.2% Habu-Gift	5.0 ccm
<i>M</i> /100 Diphenylphosphat	10.0 „
Puffer	5.0 „

Dieses Gemisch wurde in Brutsehrank von 37° bei PH 8.2 stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurde 5 ccm Versuchslösung in ein Messzylinder einpipettiert, und der PH durch Zusatz von 10% Salzsäure auf 4 gebracht, mit 4 ccm Phosphomonoesterase versetzt und dann, die gesamte Menge mit Wasser auf 10 ccm gebracht. Nach 4.5 Stunden wurde die P-Bestimmung ausgeführt. P war auf 1 ccm Lösung umgerechnet 0.051 mg, also 33% Hydrolyse.

6. Nichtspaltbarkeit des Caseinhydrolysats durch die isolier-

ten Phosphatasen, die in saurer Reaktion wirksam sind. P in 1 ccm Caseinhydrolysat war 0.1983 mg.

PH 4	I	II	III	IV
Caseinhydrolysat	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
Phosphomonoesterase	5 „	0 „	5 „	5 „
Pyrophosphatase	0 „	5 „	5 „	0 „
Pyrophosphatasen-aktivator	0 „	0 „	5 „	0 „
0.2% Habu-Gift	0 „	0 „	0 „	5 „
Puffer	5 „	5 „	5 „	5 „
Wasser	5 „	5 „	0 „	0 „
nach 24 Std.	P in mg	0	0	0
	%	0	0	0

7. Spaltung des peptisch-tryptischen Caseinhydrolysats durch die alkalische Phosphomonoesterase, die nach Satoh (1934) aus dem Kaninchenlungenautolysat isoliert wurde. Aktivität der Fermentlösung war wie folgt.

<i>M/100</i> Glyeerophosphat od.	
<i>M/100</i> Pyrophosphat	3.0 ccm
Phosphomonoesterase	3.0 „
Puffer	5.0 „
Wasser	3.0 „
<i>M/10</i> MgCl ₂ od. Wasser	1.0 „

PH 8.5	I	II	III	IV
Glyeerophosphat	3 ccm	3 ccm	0 ccm	0 ccm
Pyrophosphat	0 „	0 „	3 „	3 „
Phosphomonoesterase	3 „	3 „	3 „	3 „
Puffer	5 „	5 „	5 „	5 „
Wasser	4 „	3 „	4 „	3 „
<i>M/10</i> MgCl ₂	0 „	1 „	0 „	1 „
nach 18 Std.	P in mg	0.0342	0.0632	0.0033
	%	55.0	101.0	2.5
				3.1

Diese alkalische Monoesterase wurde auf das peptisch-trypische Hydrolysat ohne oder mit Diesterase zusammen wirken gelassen. Gesamt-P-Gehalt in 1 ccm des Hydrolysats war 0.2661 mg.

PH 8.4		I	II	III
Caseinhydrolysat		3 ccm	3 ccm	3 ccm
Phosphomonoesterase		3 „	3 „	3 „
0.2% Habu-Gift		0 „	0 „	3 „
Puffer		5 „	5 „	5 „
Wasser		4 „	3 „	0 „
M/10 MgCl ₂		0 „	1 „	1 „
nach 18 Stdn.	P in mg	0.00924	0.0143	0.00855
	%	17.0	27.0	16.0
nach 40 Stdn.	P in mg	0.0192	0.020	0.0196
	%	41.0	43.0	42.0

8. Spaltung des Caseinhydrolysats durch Kaninchenerythrocytenlösung. 1 ccm Hydrolysat enthielt 0.266 mg P in 1 ccm.

Fermentlösung	3.0 ccm
Caseinhydrolysat od.	
M/100 Glycerophosphat	4.0 „
Puffer	3.0 „

PH 5.6		Glycerophosphat		Caseinhydrolysat	
nach 20 Stdn.	P in mg	%	P in mg	%	
	0.0446	48.0	0.00825	10.3	

9. Nichtspaltbarkeit des Caseinhydrolysats durch die alkalische Hefe-Monoesterase. Caseinhydrolysat war dasselbe wie beim Versuch 8.

Fermentlösung	3 ccm
M/100 Glycerophosphat od.	
Caseinhydrolysat	3 „
Wasser	3 „
Puffer	6 „

PH 8.2	Glycerophosphat		Caseinhydrolysat	
	P in mg	%	P in mg	%
nach 22 Stdn.	0.0183	29.5	0	0

10. Spaltung des Caseinhydrolysats durch Reiskleien-Monoesterase. Wässriger Reiskleienextrakt wurde nach Uzawa (1932) mit Tonerde dreimal behandelt. Die so gewonnene Monoesterase war diesterasefrei.

Fermentlösung	3.0 ccm
M/100 Glycerophosphat,	
M/100 Diphenylphosphat	
od. Caseinhydrolysat	3.0 „
Puffer	6.0 „
Wasser	3.0 „

PH 5.6	Glycerophosphat		Diphenylphosphat		Caseinhydrolysat	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
nach 24 Stdn.	0.0556	89.6	0	0	0.0420	80.0

11. Gewinnung des gegen Glycerophosphat wirksamen, aber das Caseinhydrolysat nicht spaltenden Ferments aus dem Reiskleienextrakt. Die Ausgangslösung war die diesterasefreie Fermentlösung, die bei dem Versuch 10 gebraucht wurde.

Ferment	5.0 ccm
Tonerdesuspension	2.0 „
Acetatpuffer (PH 5.6)	3.0 „

Dieses Gemisch wurde im Wasserbad von 37° unter bisweilgum Umschütteln stehen gelassen. Nach 1 Stunde wurde es zentrifugiert, die überstehende Lösung als Ferment gebraucht. Das gebrauchte Caseinhydrolysat war dasselbe wie bei dem Versuch 10.

Fermentlösung	3.0 ccm
M/100 Glycerophosphat	
od. Caseinhydrolysat	3.0 „
Puffer	6.0 „
Wasser	3.0 „

PH 5.6	Glycerophosphat		Caseinhydrolysat	
	P in mg	%	P in mg	%
nach 24 Stdn.	0.0224	36.1	0	0

12. Nichtspaltbarkeit des Caseinhydrolysats durch die Aminopolypeptidase resp. Dipeptidase + die Phosphomonoesterase aus Reiskleien, die gegen das Glycerophosphat wirksam, aber das Caseinhydrolysat nicht zu dephosphorieren im Stande ist.

Beide Peptidasen wurden nach Grassmann (1930, 1934) aus Hefeauteoly sat isoliert. Sie zeigten die folgende Aktivität.

<i>M/10</i> Glycyl-asparagin od.			
Glycyl-glycylasparagin	3.0	ccm	
Fermentlösung	2.0	„	
Puffer	5.0	„	

PH 7	Aminopolypeptidase		Dipeptidase	
	4 Stdn.	24 Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.
Glycyl-glycyl- asparagin	60%	73%	1%	0%
Glycyl- asparagin	0%	19%	11.8%	57.8%

Wirkung der Peptidasen auf das Caseinhydrolysat wurde wie folgt untersucht.

I	II
Aminopolypeptidase	5 ccm
Caseinhydrolysat	5 „
Puffer (PH 7.6)	5 „

Jedes Gemisch wurde im Brutschrank von 37° bei PH 7.6 stehen gelassen. Nach 6 Stunden wurde 4 ccm jeden Gemisches mit 10% HCl auf PH 5.6 gebracht, mit Wasser auf 5 ccm gefüllt und darauf die Reiskleienfermentlösung wie folgt wirken gelassen.

Gemisch I od. II	5.0	ccm
Phosphomonoesterase	4.0	„
Puffer	3.0	„

Nach 22 Stunden konnte keine Abspaltung der Phosphorsäure nachgewiesen werden.

LITERATUR.

Asakawa, K. (1928): Journ. of Biochem., **10**, 157.
Biffi, U. (1897): Virchows Archiv., **152**, 130.
Grassmann, W. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chemie., **186**, 36.
Grassmann, W. (1934): Biochem. Zeitschr., **271**, 216.
Hori, W. (1932): Journ. of Biochem., **16**, 2.
Ichihara, M. (1933): Journ. of Biochem., **18**, 87.
Kobayashi, H. (1927): Journ. of Biochem., **8**, 205.
Kobayashi, C. (1936): Journ. of Biochem., **24**, 369.
Kurata, K. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 25.
Levene, P. A. (1933): Journ. of Biological Chem., **101**, 847.
Lippmann, F. (1933): Biochem. Zeitschr., **262**, 3.
Martland, M. u. Robison, R. (1926): Biochem. Journ., **20**, 847.
Plimmer, R. H. A. und Bayliss, W. M. (1906): Journ. Physiology, **33**, 439.
Rimington, C. u. Kay, H. D. (1926): Biochem. Journ., **20**, 777.
Rimington, C. (1927): Biochem. Journ., **21**, 1179.
Satoh, T. (1935): Journ. of Biochem., **21**, 19.
Uzawa, S. (1932): Journ. of Biochem., **15**, 19.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XXIX. A few supplementary notes on the estimation of nonamino-sugars by the Diche, Tillmans, and Philippi methods.

BY

HUMIO HISAMURA.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imp. University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, June 11, 1937)

I. INTENSITIES OF COLOUR DEVELOPED BY HEXOSES, GLUCURONIC ACID AND PENTOSES.

Coloration of sugars was observed which was produced by the orcinol method of Tillmans and Philippi simplified by Ozaki (1936), the original indole of Dische and the phloroglucinol of the same author as modified below. The figures obtained are embodied in Tables I, II and III and the curves of Fig. 1, 2 and 3 were plotted therefrom.

For analysis by means of phloroglucinol, the reaction mixture which was prepared according to the original direction was placed in a boiling bath for 3 minutes and the colour thus developed was compared, through an orange filter attached to a Duboscq colorimeter (Pellin), against an artificial standard which was composed of 10 cc. of the cresol red stock solution of Clark and Lubs and 190 cc. of the phosphate buffer solution at pH 7. The filter was used with the view of mutual comparison of the greenish yellow colour produced by hexoses, the brown, by glucuronic acid, and xylose, and the red, by arabinose. Furthermore, the time of measurement was taken at the 30th minute from the end of heating because the depth of it decreased gradually and remained constant between the 20th and 60th minutes in all of the sugars listed in the tables.

As will be seen from the figures, the degree of coloration by the various reactions was of straight line functions within the limits characteristic of individual sugars.

EXPERIMENTAL.

Glucose (*Saccharum amylaceum puris anhydrium*, E. Merck), mannose (E. Merck 5895), galactose (E. Merck 4060), glucuronic acid (prepared according to Masamune (1933)), arabinose (E. Merck, 4, 1461), and xylose (Schering-Kahlbaum, 04081) were used after constant drying *in vacuo* at room temperature.

Orcinol reaction.

For colour comparison 0.01% glucose solution was taken and its reaction mixture was set at 20 mm of a colorimeter as the standard.

TABLE I.

Glucuronic acid

Cone. of sugar	Reading	
	mm	reversal $\times 10^2$
0.0075	31.92	3.13
0.01	25.10	3.98
0.015	19.14	5.22
0.02	15.20	6.58
0.025	12.15	8.23
0.03	10.12	9.88
0.04	7.70	12.98
0.05	6.65	15.04

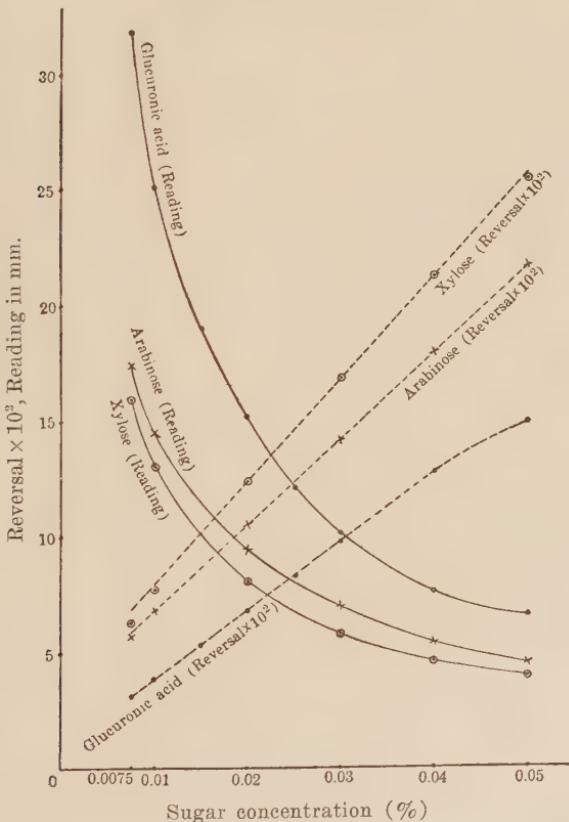
Arabinose

0.0075	17.44	5.73
0.01	14.54	6.88
0.02	9.36	10.68
0.03	7.0	14.30
0.04	5.52	18.11
0.05	4.58	21.80

Xylose

0.0075		16.02	6.24
0.01		13.11	7.63
0.02		8.05	12.40
0.03		5.90	16.95
0.04		4.70	21.28
0.05		3.94	24.40

Fig. 1. Orcinol reaction.



The curves show that the limits within which the colour development is of straight line functions were from 0.0075 to 0.04% for glucuronic acid, from 0.0075 to 0.05% for arabinose and from 0.01 to 0.05% for xylose.

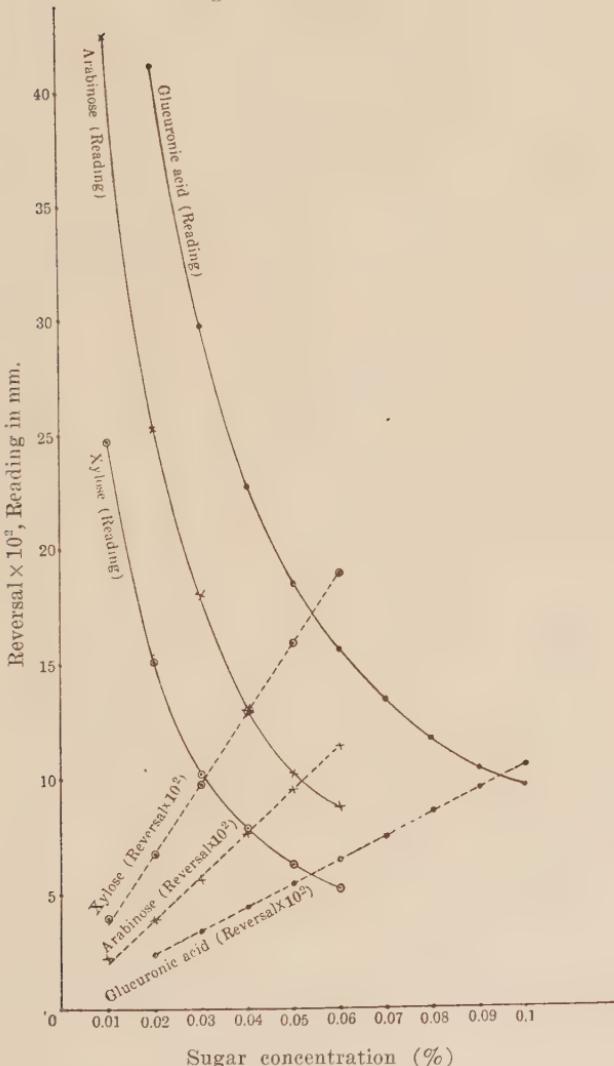
Indole reaction.

The coloration of a 0.01% glucose solution was employed as the standard and this reaction mixture was set at 20 mm of the colorimeter.

TABLE II.

Cons. of sugar.	Glucuronic acid	
	mm	reversal $\times 10^2$
0.02	41.21	2.43
0.03	29.80	3.36
0.04	22.75	4.40
0.05	18.36	5.45
0.06	15.63	6.40
0.07	13.46	7.43
0.08	11.73	8.52
0.09	10.39	9.62
0.1	9.68	19.33
Arabinose		
0.01	42.62	2.35
0.02	25.34	3.94
0.03	18.06	5.50
0.04	13.12	7.62
0.05	10.42	9.60
0.06	8.68	11.50
Xylose		
0.01	24.74	4.0
0.02	15.08	6.63
0.03	10.20	9.80
0.04	7.70	13.0
0.05	6.20	16.11
0.06	5.23	19.12

Fig. 2. Indole reaction.



The ranges where the colour development is proportional to the sugar concentration were:

Glucuronic acid:	0.02–0.1 %
Arabinose:	0.02–0.06 ,
Xylose:	0.01–0.06 ,

Phloroglucinol reaction.

The standard solution for colorimetry was set at 20 mm.

TABLE III.

Glucuronic acid.		
Conc. of sugar	Reading	
	mm	reversal $\times 10^2$
0.01	18.44	5.42
0.02	10.18	9.82
0.03	7.10	14.08
0.04	5.75	17.39
0.05	4.98	20.08
Glucose.		
0.02	30.0	3.34
0.03	23.9	4.18
0.04	20.2	4.95
0.05	17.0	5.88
0.06	14.9	6.71
0.07	13.36	7.49
0.08	12.3	8.13
0.09	11.6	8.62
Mannose.		
0.01	27.76	3.60
0.02	12.90	7.75
0.03	8.66	11.56
0.04	7.12	14.05
0.05	6.68	14.97
Galactose.		
0.01	19.40	5.15
0.02	10.70	9.34
0.03	7.30	13.69
0.04	6.26	15.98
0.05	6.02	16.61

Arabinose.

0.005	18.52	5.40
0.0075	17.0	5.88
0.01	15.58	6.42
0.02	12.24	8.17
0.03	10.32	9.69
0.04	9.10	11.0
0.05	7.98	12.53

Xylose.

0.005	20.84	4.80
0.0075	18.22	5.34
0.01	16.12	6.20
0.02	12.50	8.0
0.03	10.20	9.80
0.04	8.86	11.31
0.05	7.86	12.72

Fig. 3. Phloroglucinol reaction.

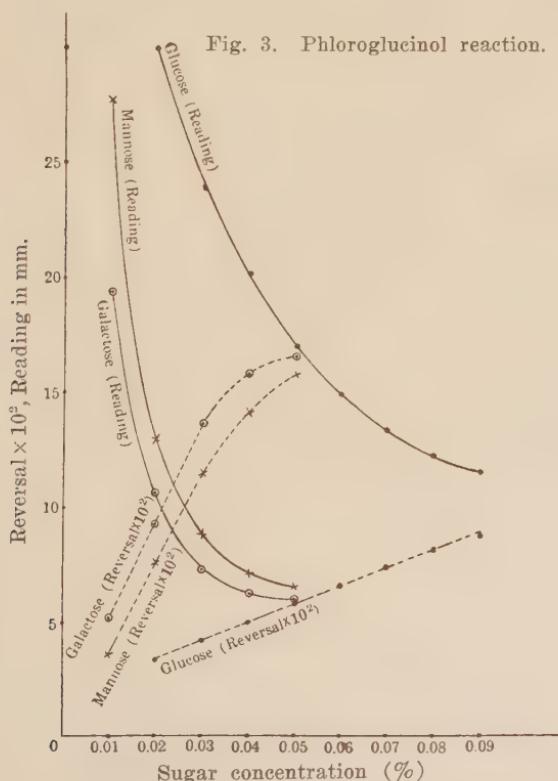
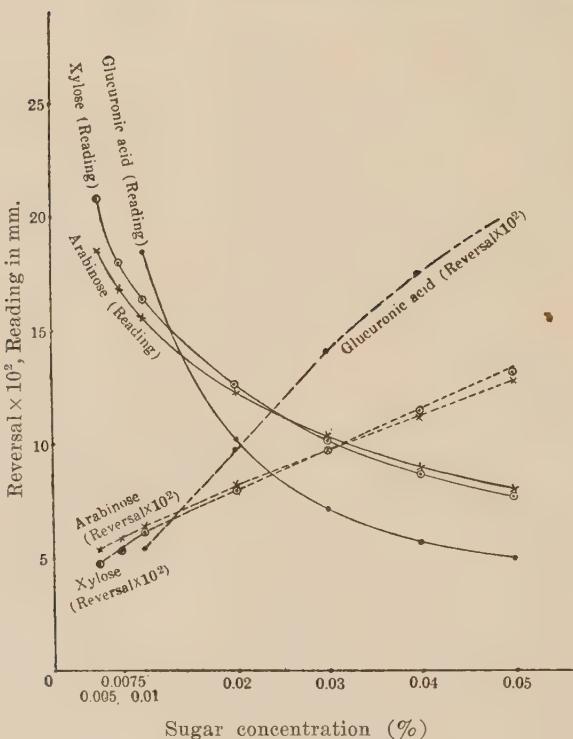


Fig. 4. Phloroglucinol reaction.



The ranges where the colour intensities are of straight line functions were:

Glucuronic acid:	0.01–0.03 %
Glucose:	0.02–0.09 „
Mannose:	0.01–0.03 „
Galactose:	0.01–0.03 „
Arabinose:	0.01–0.05 „
Xylose:	0.01–0.05 „

II. EFFECT OF AMINOSUGARS ON THE COLOUR DEVELOPMENT OF NONAMINO-SUGARS.

Although aminosugars are not entirely devoid of the power of

colour development as was demonstrated by Dische and Popper (1936) and also shown below, they have a simultaneously tendency to reduce the coloration of nonamino-sugars which are involved in a solution together with them. That the production of the dyestuffs derived from nonamino-sugars are not yet influenced strikingly by an aminosugar, even of a large mass, is probably to be attributed to the mutual compensation between both the above properties of the latter.

Experimental.

The sugar solutions were each prepared directly before use. The analytical procedures employed were the same as before, except where especially mentioned. The chlorhydrates of glucosamine and of chondrosamine were prepared according to Ledderhose and to Levene, and dried constant at room temperature.

A. Colour development of aminosugars.

TABLE IV.

Orcinol method.

The standard solution was set at 5 mm of the colorimeter.

Glucosamine hydrochloride 0.25%	18.2 mm (Reading)
Chondrosamine hydrochloride 0.25%	15.1 "

Indole method.

The standard solution was set at 10 mm of the colorimeter.

Glucosamine hydrochloride 0.25%	24.6 "
Chondrosamine hydrochloride 0.25%	16.5 "

Phloroglucinol method.

Artificial standard was set at 5 mm.

Glucosamine hydrochloride 0.25%	37.0 "
Chondrosamine hydrochloride 0.25%	36.8 "

B. Effect of an aminosugar on coloration of a hexose or glucuronic acid.

TABLE V.

Solutions of a nonamino- and an amino-sugar were prepared separately and combined together in the proportions indicated in the first column of the table. The readings on the right hand side are those observed on the solutions of the nonamino-sugars diluted with water in volume equal to that of the aminosugar solutions taken in individual mixtures.

Orcinol method.		
Total concentration and composition of sugar mixture	Reading (mm)	Reading of nonamino-sugar solution (mm)
0.04% [Glucose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	13.34	12.6
0.03% [Glucose + Chondrosamine-HCl (1:2)]	20.8	20.0
0.04% [Mannose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	10.7	10.0
0.03% [Mannose + Chondrosamine-HCl (1:2)]	18.4	17.0
0.02% [Galactose + Glucosamine-HCl (2:1)]	13.9	13.5
0.04% [Galactose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	10.2	9.6
0.03% [Galactose + Chondrosamine-HCl (1:2)]	17.8	16.7
0.04% [Glucuronic acid + Glucosamine-HCl (1:1)]	16.9	15.2
0.04% [Glucuronic acid + Glucosamine-HCl (1:3)]	27.1	25.1
0.04% [Glucuronic acid + Chondrosamine-HCl (1:1)]	16.50	15.2
0.04% [Glucuronic acid + Chondrosamine-HCl (1:3)]	27.0	25.1
0.22% [Galactose + Glucosamine-HCl (1:10)]	9.26	9.64
Indole method.		
0.04% [Glucose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	12.0	10.5
0.03% [Glucose + Chondrosamine-HCl (1:2)]	21.0	20.0
0.03% [Mannose + Glucosamine-HCl (2:1)]	16.1	14.7
0.02% [Mannose + Glucosamine-HCl (1:1)]	29.2	27.4
0.03% [Mannose + Glucosamine-HCl (1:1)]	21.5	19.1
0.04% [Mannose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	15.6	14.7
0.03% [Mannose + Chondrosamine-HCl (1:2)]	27.9	27.4
0.02% [Galactose + Glucosamine-HCl (2:1)]	21.1	19.7
0.03% [Galactose + Glucosamine-HCl (2:1)]	14.2	13.5
0.02% [Galactose + Glucosamine-HCl (1:1)]	26.9	25.3
0.03% [Galactose + Glucosamine-HCl (1:1)]	17.8	17.6
0.04% [Galactose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	14.5	13.5
0.03% [Galactose + Chondrosamine-HCl (1:2)]	26.2	25.3
0.04% [Glucuronic acid + Chondrosamine-HCl (1:1)]	42.6	41.2
0.22% [Galactose + Glucosamine-HCl (1:10)]	12.98	13.5

Phloroglucinol method.

0.03% [Mannose + Glucosamine-HCl (2:1)]	13.6	12.7
0.02% [Mannose + Glucosamine-HCl (1:1)]	28.4	27.8
0.04% [Mannose + Chondrosamine-HCl (1:1)]	14.9	12.7
0.02% [Galactose + Glucosamine-HCl (2:1)]	15.3	14.9
0.04% [Galactose + Chondrosamid-HCl (1:1)]	11.8	10.7
0.04% [Glucuronic acid + Chondrosamine-HCl (1:3)]	21.1	18.4
0.22% [Galactose + Glucosamine-HCl (1:10)]	10.36	10.7

III. COLORATION OF MIXTURES OF NONAMINO-SUGARS.

For direct application of the colorimetric procedures to proteins which contain more than one kind of nonamino-sugars, it is of primary importance to see in what depth mixtures of the sugars develop colour. With respect to this relation, the following three possibilities are conceivable:

1. The colour intensity of a mixture corresponds to the total sum of those which are developed by individual sugars when present alone in a solution.

2. The colour development of one sugar is depressed according to the formula below, depending upon the quality and quantity of the other sugar co-existent in the mixture:

where a is the concentration of sugar A, and b that of B.

3. The colour depth of a mixture is entirely independent of those of individual sugars, owing to the formation of a new reaction product.

As will be shown by the figures in Table VI, the second possibility was proved to be what occurs in fact. Consequently, one can evaluate the amount by the above formula and also determine, by further comparison of sugar concentrations observed in various reactions, the kind of one of two sugars in a mixture, provided that the other sugar in the mixture is known in quality and quantity. In many glycoproteins, glucuronic acid is involved as

one of the constituents of the prosthetic group and, as it can be determined by furfural production or other processes, a true sugar which is present as another component can be identified and estimated quantitatively in this manner.

Experimental.

TABLE VI.

Orcinol reaction.

Total sugar conc. and components	Reading				
	observed (mm)	Calc. according to the first possibility		Calc. according to the second possibility	
		(mm)	Discrepancy from that observed (% of the observed col. depth)	(mm)	Discrepancy from that observed (% of the observed col. depth)
0.01% [Glucose + Mannose (1:2)]	18.50			18.0	+2.8
0.03% [Glucose + Mannose (2:1)]	9.14	7.21	+26.8	9.13	+0.1
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (1:2)]	21.38			21.64	-1.57
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (2:1)]	19.04			19.06	-0.1
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (1:1)]	8.38	7.63	+9.8	8.33	+0.6
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (1:2)]	8.58	8.03	+6.9	8.85	-3.1
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (2:1)]	7.52	7.14	+5.3	7.87	-4.4
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (1:2)]	21.36			21.46	-0.5
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (2:1)]	18.70			18.76	-0.3
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (1:2)]	8.32	7.95	+4.6	8.53	-2.6
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (2:1)]	7.26	7.0	+3.7	7.38	-1.6

Indol reaction.

0.01% [Glucose + Mannose (1:2)]	24.74			24.19	+ 2.3
0.03% [Glucose + Mannose (2:1)]	8.38	7.58	+ 10.6	8.11	+ 3.3
0.01% [Glucose + Glucuronic acid (1:1)]	29.46			30.08	- 2.0
0.01% [Glucose + Glucuronic acid (1:2)]	35.88			35.72	+ 0.5
0.01% [Glucose + Glucuronic acid (2:1)]	25.04			25.32	- 1.1
0.03% [Glucose + Glucuronic acid (1:1)]	11.54	10.55	+ 9.4	11.78	- 2.0
0.03% [Glucose + Glucuronic acid (1:2)]	14.32	13.48	+ 6.2	14.76	- 3.0
0.03% [Glucose + Glucuronic acid (2:1)]	9.54	8.54	+11.7	9.80	- 3.7
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (1:1)]	36.70			37.73	- 2.7
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (1:2)]	42.78			43.10	- 0.8
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (2:1)]	33.40			33.52	- 0.3
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (1:1)]	14.94	14.03	+ 6.5	15.25	- 2.0
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (1:2)]	18.12	16.46	+10.1	18.29	- 0.9
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (2:1)]	12.98	12.74	+ 1.9	13.12	- 1.1
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (1:1)]	35.12			35.65	- 1.5
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (1:2)]	40.28			41.32	- 2.5
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (2:1)]	28.88			28.86	+ 0.1
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (1:1)]	14.18	12.7	+11.7	14.64	- 3.1
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (1:2)]	16.80	15.68	+ 7.1	17.63	- 4.7
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (2:1)]	12.08	10.46	+15.5	12.51	- 3.4

Phloroglucinol reaction.

0.01% [Glucose + Mannose (1:2)]	34.52			33.57	+2.1
0.03% [Glucose + Mannose (2:1)]	15.24	14.43	+ 5.6	15.1	+0.9
0.02% [Mannose + Galactose (1:2)]	11.50			11.32	+1.6
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (1:2)]	20.86			20.75	+0.5
0.01% [Mannose + Glucuronic acid (2:1)]	24.26			24.0	+1.1
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (1:2)]	7.50	7.46	+ 0.5	7.55	-0.7
0.03% [Mannose + Glucuronic acid (2:1)]	8.08	7.60	+ 6.3	8.07	+0.1
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (1:2)]	18.48			18.75	-1.4
0.01% [Galactose + Glucuronic acid (2:1)]	19.02			19.07	-0.3
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (1:2)]	7.40	6.70	+10.5	7.17	+3.2
0.03% [Galactose + Glucuronic acid (2:1)]	7.84	6.78	+15.6	7.70	+1.8

The analytical procedures were those employed already.

The expenses of this work were defrayed by a grant from the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan, which is gratefully acknowledged.

REFERENCES.

Dische, Z. u. Popper, H. (1926): Biochem. Z., **175**, 371.
 Ledderhose, H. G. (1878, 1880): Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., **2**, 213; **4**, 139.
 Levene, P. A. (1916): J. Biol. Chem., **26**, 143.
 Masamune, H. (1933): J. Biochem., **18**, 259.
 Ozaki, G. (1936): J. Biochem., **24**, 73.
 Tillmans, J. and Philippi, K. (1929): Biochem. Z., **215**, 40.

STUDIES ON A DIAMINO ACID, CANAVANIN.

VI. The formation of desamino canavanin from canavanin.

By

MATSUNOSUKE KITAGAWA AND JIRO TSUKAMOTO.

(*Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyushu Imperial University, Fukuoka.*)

(Received for publication, June 28, 1937)

Certain canavanin preparations, refined by the flavianic acid method, sometimes indicate Sakaguchi's colour reaction which is lacking in pure canavanin, as reported in the previous paper (1937). Recently, on the occasion of the purification of such a preparation, we have accidentally found a contaminating substance, which shows a distinct Sakaguchi's reaction and which differs markedly from canavanin in several respects.

Afterwards it became known that on heating in the aqueous solution, canavanin easily liberates ammonia and is converted into the above substance. This reaction takes place to some extent even at a comparatively low temperature, such as 28°, and also in the process of the isolation of canavanin; therefore, this reaction will occur spontaneously, producing the substance which consequently contaminates canavanin.

As a result of investigating its properties, this substance was found to be a new compound of the molecular formula, $C_5H_9O_3N_3$, and of the constitutional formula,
$$\begin{array}{c} O\cdot CH_2\cdot CH_2 \\ | \\ NH\cdot C(NH)\cdot NH \end{array} \longrightarrow CH\cdot COOH$$
. It was, therefore, named desamino canavanin after the mode of its formation.

I. THE FORMATION OF DESAMINO CANAVANIN FROM CANAVANIN, AND ITS ISOLATION.

I. *The isolation of desamino canavanin.*

An aqueous solution of canavanin (about three per cent.) was

boiled for thirteen hours and the solution was evaporated under reduced pressure, so that it was crystallised. The crystalline product was washed with a small amount of cold 80 per cent. alcohol to remove the remaining canavanin and other impurities.

The substance thus obtained was recrystallised from hot dilute alcohol. In this way, 0.50 g of canavanin yielded 0.15 g of this substance, which amounted to 33 per cent. of the theoretical. This product differs considerably from canavanin in many points. The ammonia produced during this reaction amounted to 21 per cent. of the initial total nitrogen of canavanin.

For further purification, it was converted into copper salt by adding copper acetate solution to the aqueous solution, this copper salt being scarcely soluble in water. After washing it sufficiently with cold water, it was dissolved in a dilute H_2SO_4 solution and decomposed by hydrogen sulphide. The free substance thus obtained was recrystallised from alcohol.

II. The formation of desamino canavanin from canavanin.

Free canavanin is heated in an aqueous solution, so that it easily liberates one molecule of ammonia to be converted into a condensation product, desamino canavanin. This reaction is shown in the following equations:



The yield of this substance is better in the case of canavanin being boiled with 90 per cent. alcohol rather than with water, because the desamino canavanin produced is further decomposed in boiling aqueous solution than it is in boiling alcohol. Namely, on treating canavanin with boiling 90 per cent. alcohol for eighteen hours, 0.25 g of the product was obtained from 0.50 g of canavanin and the yield amounted to 56 per cent. of the theoretical.

In order to determine whether this reaction is a kind of hydrolysis, canavanin was treated with boiling absolute ethyl alcohol for nine hours, in which canavanin is slightly soluble. On judging from the amount of ammonia produced, 15 per cent. of initial

canavanin was known to undergo a change. On the other hand, in the case of boiling with 90 per cent. alcohol, in which canavanin is quite soluble, the rate of decomposition of canavanin for eight hours amounted to 70 per cent. of its initial quantity, and in the case of water as a medium, it amounted to 76 per cent. for seven hours.

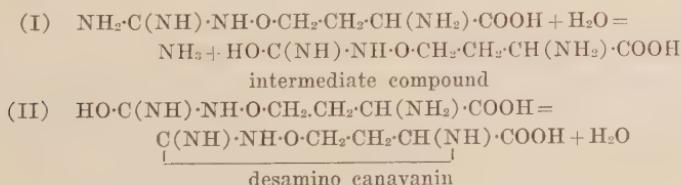
In the first case, water seems to be unnecessary for the reaction, though the reaction proceeds very slowly, but, in the latter two, it is clear that water accelerates this reaction.

This reaction occurs even at a comparatively low temperature, such as 37°; for instance, when 17 per cent. canavanin alcoholic solution was allowed to stand at 37° for one week, 1 g of canavanin yielded 0.43 g of this substance, or 46 per cent. of the theoretical. The liberated ammonia amounted to 15 per cent. of the total canavanin nitrogen. Furthermore, this decomposition is observed to some extent even at room temperature, that is, canavanin was decomposed at 28° after 12 days at the following rate:

Medium	Rate of decomposition (%)
75% alcohol	34
Water	16

In general, this reaction seems to be accelerated by ethyl alcohol, especially at a low temperature. Canavanin, which is considered purely isolated by flavianic acid, sometimes indicates Sakaguchi's reaction, since desamino canavanin thus spontaneously produced from canavanin during the isolation contaminates it.

To explain the mechanism of this reaction in the presence of water, we assume two successive reactions, namely, the hydrolysis of canavanin as the first stage (I) and the intramolecular condensation of a supposed intermediate compound into desamino canavanin as the next stage (II), as follows:

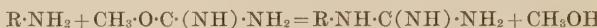


If boiled in absolute alcohol, the reaction will occur in the following manner:



Thus the guanidoxy-amino group of canavanin is very reactive in comparison with the guanido-amino group of arginine. In fact, the former is also easily acted on by nitrous acid as shown later.

The supposed intermediate compound is considered to be a derivative of isourea and its $\text{HO}\cdot\text{C}(\text{NH})\cdot\text{NH}$ -group may easily be condensed with α -amino group in a way similar to the formation of guanidine derivative by the action of methylisourea on amino compound as follows:



II. THE PROPERTIES OF DESAMINO CANAVANIN.

I. The properties of desamino canavanin and its constitution.

Desamino canavanin is less soluble in water than is canavanin and is not soluble in alcohol. It crystallizes in needles from aqueous alcoholic solution. It changes to a dark colour at about 245° and melts at 256° – 257° under decomposition. Its aqueous solution give a very slightly acid reaction to litmus and its acidity does not increase on the addition of neutral formol. It is dextro-rotatory in an aqueous solution (a) and laevorotatory in an aqueous solution which contains equivalent caustic soda (b), as follows:

$$(a) \quad [\alpha]_D^{21} = \frac{+1.36 \times 100}{2.556 \times 2} = +26.61^\circ$$

$$(b) \quad [\alpha]_D^{23} = \frac{-2.17 \times 100}{2.404 \times 2} = -45.14^\circ$$

Diminishing the basic property in comparison with canavanin, it is no longer sufficiently precipitated by the canavanin precipitants, that is, it is not precipitated at all by mercuric chloride

and sodium acetate, scarcely by phosphotungstic acid at ordinary temperature, and does not give a precipitable salt with flavianic acid and picric acid. On the other hand, its copper salt is slightly soluble in water.

It does not indicate a ninhydrin reaction, but on boiling with acid for a long time, the reaction becomes distinctly positive, although on boiling with 10% HCl for three hours, only a slight reaction is recognized. These facts show that this substance contains in its molecule the α -amino group which, however, is combined with other group and is latent therein. Moreover, this combination is very firm in comparison with that of *N*-acylamino acid.

It shows Sakaguchi's reaction which is distinct even in a dilute solution (1:500,000). According to Poller's investigation (1926), this reaction is strictly characteristic of a guanidine derivative. Therefore, the instant that canavanin is converted to desamino canavanin, a kind of guanidine group will be formed in the molecule of the latter. On the other hand, the guanidine group of this substance differs more or less from that of arginine in its constitution, because there is no indication of a diacetyl reaction by this substance.

This substance gives the same colouration as canavanin by the irradiated nitroprusside solution, but the development of the colour requires more time and its sensibility (1:500) is very much lower than that of canavanin (1:10,000).

With the progress of the hydrolysis of this substance by acid, the above two reactions—Sakaguchi's reaction and the nitroprusside reaction—become gradually fainter; at the same time the ninhydrin reaction becomes inversely more intense.

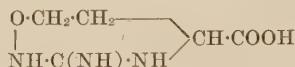
Schiff's reaction for urea derivatives, Jaffe's reaction for canalin or creatinine, Weyl's reaction for hydantoin, the ferric chloride reaction, and the biuret reaction are not shown by this substance.

It decomposes copper acetate or carbonate to form copper salt and gives ester with alcohol by the action of hydrogen chloride. The free substance is more soluble in alkalis than in water, and

the benzoyl derivative shows an acid reaction to congo red, easily dissolves in alkali, and is precipitated by acid. These points indicate clearly the presence of a carboxyl group in its molecule.

As shown later, this substance is finally converted into canalin on prolonged hydrolysis by acid.

Considering all these properties, we assume the following constitutional formula for it:



II. The molecular formula of desamino canavanin.

Analysis:

(a) Free substance, dried *in vacuo* at 100°.

Subst. 3.818 mg CO₂ 5.313 mg H₂O 2.064 mg C = 37.95% H = 6.05%
 " 4.689 mg N₂ 1.069 cc. (763.7 mm 23.6°) N = 25.85%
 " C₅H₉O₃N₃ C = 37.73, H = 5.66, N = 26.41

(b) Copper salt, dried *in vacuo* at 100°.

Subst. 4.387 mg CO₂ 5.094 mg H₂O 1.786 mg C = 31.67% H = 4.56%
 " 3.587 mg N₂ 0.689 cc. (769.7 mm 24.2°) N = 21.89%
 " 30.804 mg CuO 6.289 mg Cu = 16.31%
 (C₅H₈O₃N₃)₂Cu C = 31.60, H = 4.24, N = 22.13, Cu = 16.74

The free substance dissolves only a little in glacial acetic acid, and not in camphor or other organic solvents, but on the other hand, its benzoyl derivative dissolves in camphor.

(a) Free substance

Substance(g)	Glacial acetic acid(g)	ΔT	M
0.0537	22.5572	0.060°	162
0.0536	28.3474	0.045°	175
		C ₅ H ₉ O ₃ N ₃	159

(b) Dibenzoyl derivative

Substance(mg)	Camphor(mg)	ΔT	M
0.952	7.979	13.6°	350
1.642	9.823	16.8°	398
		C ₅ H ₇ O ₃ N ₃ (COCH ₃) ₂	367

From the above results, the molecular formula is assumed to be C₅H₉O₃N₃.

III. DERIVATIVES OF DESAMINO CANAVANIN.

I. *Dibenzoyl desamino canavanin.*

The substance was benzoylated in the alkaline solution with the alternate addition of benzoylechloride and caustic soda. After the reaction ended, the solution was sufficiently acidified by hydrochloric acid. The separated crystalline mass was washed with cold water and, after drying, it was extracted with petroleum benzine.

The residual mass was dissolved in alkali and precipitated by acid. Then it was recrystallised from alcoholic solution by adding water.

The benzoyl derivative is scarcely soluble in water and easily soluble in alcohol. It shows an acid reaction to congo red, melts at 150°–163° and is decomposed at 173°.

Substance 3.835 mg N₂ 0.366 cc. (751.0 mm 21.7°) N = 10.71%
 $C_5H_7O_3N_3(COC_6H_5)_2$ N = 11.45

II. *Ethylester hydrochloride.*

The substance was suspended in absolute ethyl alcohol and saturated with dry gaseous hydrogen chloride on cooling. After the solution was evaporated under reduced pressure, the above treatment was repeated. Then the resultant solution was condensed, so that a crystalline product was separated. This was dissolved in warm alcohol and recrystallised by adding ether to it.

The ester hydrochloride also shows Sakaguchi's reaction and the colour reaction by nitroprusside, and no longer forms copper salt. It melts at 135°.

Substance 3.157 mg N₂ 0.517 cc. (763 mm 22°) N = 18.64%
 " 52.705 mg AgCl 32.922 mg Cl = 15.45%
 $C_5H_8O_3N_3 \cdot C_2H_5 \cdot HCl$ N = 18.80, Cl = 15.86.

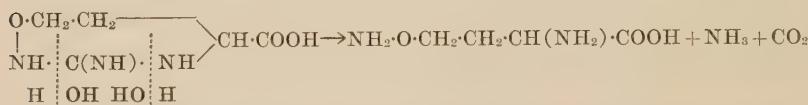
IV. CHEMICAL REACTIONS OF DESAMINO CANAVANIN.

I. *The formation of canalin from desamino canavanin by acid hydrolysis.*

When desamino canavanin was boiled with 10 per cent. HCl solution, it underwent hydrolysis, liberating ammonia, and, with

the progress of the reaction, its Sakaguchi's reaction and nitro-prusside reaction gradually became negative; simultaneously Jaffe's reaction and the ninhydrin reaction became positive inversely as described above.

These facts show that the ring of this compound is ruptured in the following manner:



The production of canalin was ascertained by the following experiment.

After the substance was boiled with 10 per cent. HCl solution for 24 hours, the resultant solution was evaporated to remove HCl as far as possible. The residue was dissolved in water, neutralised with alkali, and, on adding picric acid to it, picrate was crystallised in needles and recrystallised from hot water. The picrate melted at 193°–194° under decomposition (canalin picrate 193°–194°) and its yield amounted to 57 per cent. of the theoretical.

Substance 3.274 mg N₂ 0.532 mg (765.8 mm 18.9°) N=18.75%
Canalin picrate N=18.92

The ammonia produced amounted to 41 per cent. of the initial total nitrogen of this substance.

The free substance obtained from the picrate was crystallised from alcohol solution in needles. It melted at 211°, indicated the ninhydrin reaction and Jaffe's reaction, and was laevorotatory. When hydrogenated catalytically, it behaved in the same manner as does canalin.

Substance 3.621 mg N₂ 0.621 cc. (765 mm 18.8°) N=19.77%
C₁₁H₁₀O₈N₂(canalin) N=20.89

From its properties this final product is ascertained to be canalin.

II. The action of nitrous acid on desamino canavanin and canavanin.

(a) Desamino canavanin.

Desamino canavanin evolves only traces of free nitrogen by

the action of nitrous acid, especially at a low temperature, while α -amino acid gives the theoretical amount of nitrogen even at a low temperature. The results of the reaction carried at 3° for five minutes are shown as follows:

Desamino canavanin	8.056 mg N ₂ 0.097 cc. (765.3 mm 20.0°)
	amino-N = 0.041 mg 2.01% of total-N
Glycocoll	11.683 mg N ₂ 3.868 cc. (764.8 mm 21.3°)
	amino-N = 2.201 mg 100.91% of total-N

The evolution of nitrogen by the action of nitrous acid in the former case is slowly continued with the progress of the reaction, and when the amount of the evolved nitrogen attains about 50 per cent. of the total nitrogen, the evolution apparently ceases.

The results are given in the following table:

(a)

Desamino canavanin (mg)	Evolved nitrogen (mg)	Reaction interval	The ratio of evolved nitrogen to total-nitrogen (%)
10.164	0.161	5 minutes	6.26
„	0.525	10 „	20.45
„	1.069	90 „	41.69
9.056	1.089	7 hours	49.57
8.840	1.123	22 „	49.53

(b)

Its copper salt (mg)	Evolved nitrogen (mg)	Reaction interval	The ratio of evolved nitrogen to total-nitrogen (%)
10.881	0.167	5 minutes	6.94
9.559	0.838	2 hours	39.51
11.176	1.118	5 „	45.17
„	1.256	7 „	50.67
9.232	1.035	22 „	50.66

It is doubtful, however, whether the reaction attains the real end point, since the concentration of available nitrous acid is

considerably decreased during such a long interval of reaction. The evolved nitrogen is considered due to both the ammonia produced and α -amino group set free by the hydrolytic decomposition of this substance; accordingly, it does not necessarily mean the original presence of the amino group in its molecule.

(b) *Canavanin.*

Recently, according to T. Harada's experiment in this laboratory, canavanin was found to liberate three fourths of its total nitrogen as free nitrogen by the action of nitrous acid, and we also confirmed his experiment with results as follows:

Canavanin (mg)	Evolved nitrogen (mg)	Reaction		The ratio of evolved nitrogen to total nitrogen (%)
		Interval	Temperature	
8.844	0.804	5 minutes	3°	34.44
11.746	1.769	," "	19°	49.38
8.848	1.613	30 "	18°	59.78
"	2.015	150 "	22°	74.67
"	2.055	8 hours	18°	76.16

The guanidoxy-amino group of canavanin is liable to be liberated as ammonia on heating in an aqueous solution as described above, and now it is known that it is also easily acted on by nitrous acid as shown in the above table.

On the other hand, the guanido-amino group of arginine is almost stable on boiling in an aqueous solution for a long time, and it is scarcely acted on by nitrous acid for thirty minutes.

In spite of this instability of free canavanin in an aqueous solution, it is very stable in a boiling acid solution, and, moreover, is stable to some extent even in a boiling alkaline solution.

For instance, 0.1 g of canavanin was boiled for six hours with 10 cc. of water, 10 cc. of 10% HCl, or 15 cc. of 5% baryta separately. Then the ammonia produced by hydrolysis was determined respectively, and the rate of decomposition of canavanin was calculated from the amount of ammonia liberated.

Medium	The ratio of liberated NH ₃ -N to total-N (%)	The rate of decomposition (%)
10% HCl	traces	traces
5 % baryta	2.5	10
Water	19.0	76

Even when canavanin was boiled with conc. HCl for 24 hours, 80 per cent. of the initial canavanin was recovered unchanged as flavianate.

V. THE OCCURENCE OF A SUBSTANCE, INDICATING A MODIFIED SAKAGUCHI'S REACTION, IN JACK BEANS.

We have detected also a substance in addition to desamino canavanin in the dilute alcohol solution of canavanin which was allowed to stand at 37° for a long time.

This substance seems to be more easily produced from canavanin than is desamino canavanin. The usual canavanin preparation, therefore, is more or less contaminated with this substance which is spontaneously produced from canavanin.

This substance is not only thus produced from canavanin secondarily, but is ascertained to be contained originally in Jack beans with canavanin.

I. The isolation of this substance.

When the dilute alcohol solution of canavanin was allowed to stand at 37° for several days, this substance occurred with desamino canavanin in the solution. Then desamino canavanin and ammonia were removed from the solution as far as possible. The resultant solution contained the required substance and a small amount of residual canavanin.

This substance forms a characteristic picrate with picric acid, the picrate being separated from the solution in a viscous mass at ordinary temperature and being less soluble in water than is canavanin picrate. Making use of this property, the required substance was isolated from canavanin, that is, after evaporating the

solution into dryness, the residue was dissolved in water, and picric acid was added to the solution, until no more oily precipitate was produced. The oily precipitate was gradually crystallised on cooling and it was recrystallised from hot water.

The picrate melts at 117°–122° and is decomposed at 131°–136°.

The picrate was converted into a free substance by the usual method; the free substance, however, could not be crystallised by any means.

The flavianate of this substance is also separated in a viscous mass and melts at 175°–176° under decomposition.

II. The properties of this substance.

This substance barely gives the ordinary Sakaguchi's reaction, but gives a distinct reddish pink colouration by the reagent for the modified Sakaguchi's reaction by Weber (1930), in which hypobromite is used instead of hypochlorite.

Differing from desamino canavanin in several points, it indicates the ninhydrin reaction and the colour reaction by irradiated nitroprusside, and is precipitated by sodium acetate and mercuric chloride.

It is more soluble in dilute alcohol than canavanin and its aqueous solution is slightly alkaline to litmus (pH 7.3). It is easily decomposed on heating.

This substance is not considered as a intermediate compound produced in the change of canavanin into desamino canavanin, since desamino canavanin is not produced from this substance by any means.

Perhaps these two compounds—desamino canavanin and this substance—are produced separately from canavanin after the condition of reaction, to which canavanin was subjected.

SUMMARY.

Canavanin is stable on boiling with an acid solution. It is, however, in the free state unstable in an aqueous solution even at a comparatively low temperature, such as 30°, and undergoes

hydrolysis to be converted into a condensation product, desamino canavanin, liberating one molecule of ammonia.

Desamino canavanin gives a distinct Sakaguchi's reaction which is not given by canavanin, and has a molecular formula $C_5H_9O_3N_3$.

From its properties, we propose $\begin{array}{c} O\cdot CH_2\cdot CH_2\cdots \\ | \\ NH\cdot C(NH)\cdot NH \end{array} \begin{array}{c} > \\ CH\cdot COOH \end{array}$ for its constitutional formula.

We have also detected some unknown substance in addition to desamino canavanin in the canavanin solution which was subjected to the above change.

This substance is an amino acid differing from canavanin in several points. It is not only produced from canavanin secondarily, but is also contained in Jack beans originally.

REFERENCES.

Kitagawa, M. (1937): *Jour. biochem.*, **25**, 23.
Poller, K. (1926): *Ber.*, **59**, 1927.
Weber, C. J. (1930): *Jour. biol. chem.*, **86**, 217.

STUDIEN ÜBER DIE ARGINASE. II.

VON

TAKEO IWABUCHI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 9. Juli 1937)

Arginase wurde zuerst von Kossel und Dakin (1904) in der Leber und anderen Organen aufgefunden. Dieses Ferment nimmt nicht nur an dem Abbau des Arginins teil, sondern auch, wie jetzt allgemein anerkannt, als ein Teilferment an der Harnstoffsynthese in vivo. Angesichts der grossen physiologischen Bedeutung dieses Ferments wurden bisher schon viele Arbeiten mit der Organarginase ausgeführt und ihre Beeinflussbarkeit durch physikalische oder chemische Faktoren ist heutzutage in mancher Hinsicht gut erforscht. Aber Studien über die Arginase des Blutes giebt es verhältnismässig wenig. Nach Kossel und Dakin (1904) war das Ferment im Hundeblut nicht sicher nachweisbar. Edlbacher und Röthler (1925) konnten keine Arginase in Blut von solchen Tieren wie Hund, Katze, Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Taube oder Gans nachweisen. Später haben aber Edlbacher, Krause und Merz (1927) das Ferment in Menschen-, Rinder- und Schweineblut und zwar in den Erythrocyten gefunden. Weil und Russell (1934) haben den Arginasegehalt des Rattenblutes gemessen. Die angewandte Methodik war die manometrische Bestimmung des Harnstoffes, der aus der sehr verdiünnten Argininlösung fermentativ gebildet wurde. Die relativ grosse Menge des präformierten Blutharnstoffes in Betracht ziehend, scheint mir diese verfeinerte Methode noch dem Kriterium zu unterliegen.

Ich habe in voriger Mitteilung (1936) ein neues Verfahren des Arginasenachweises angegeben. Es beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung des als Flavianat gefällten Arginins, das in bestimmter Zeit fermentativ nicht gespalten zurückgeblieben war.

Über eine kleine Modifikation siehe den experimentellen Teil. Soweit die selektive und quantitative Fällung des Argininflavians, was durch den 100% Argininnachweis bei der sofort nach der Versuchsanstellung auszuführende Bestimmung leicht bestätigt wird, nicht verhindert wird, kann man der Versuchslösung ohne Verzögerung recht verschiedene Substanzen zusetzen, weil in diesem Messverfahren das zweitstufige Einwirken der Urease, die gegen manche Zusätze sehr empfindlich ist und ausserdem noch manchmal die unter Arginase-Wirkung den Harnstoff liefernde Substanzen enthalten kann, weggelassen wird. Ich konnte damit die spezifische aktivierende Wirkung des Mn-Ions bestätigen. In vorliegender Mitteilung wird über die Versuche mit der Blutarginase berichtet.

Argininspaltung durch Vollblut und durch die Erythrocyten aus demselben Blut wurde verglichen. Beim Menschen, Schwein und Rind wurde immer starke Aktivierung durch Mn-Zusatz beobachtet, aber die Arginasewirkung der Erythrocyten war stärker als die des Vollblutes, was auf dem hemmenden Einfluss des Plasmas beruhen muss (Tabelle I u. II), weil keine Beeinflussbarkeit der Erythrocytenarginase durch Oxalatzusatz andererseits bewiesen werden konnte. Menschenserum, normale sowie von Tumorleidenden, waren frei von Arginase. Auch Mn-Zusatz lässt nicht die Arginasewirkung auftreten (Tabelle III). Ich möchte hier noch hinzufügen, dass die Erythrocyten der Tumorkranken und der normalen Menschen eine gleichgradige Argininspaltung auszuüben imstande sind (Tabelle IV). Arginasebestimmung im Blut kann daher nicht der Tumordiagnose dienen. Der früheren Angabe von Haddow (1931) über die anscheinende Zunahme der Blutarginase bei malignen Tumoren stelle ich mich damit entgegen.

Arginase der Menschenererythrocyten wird durch Glutathion nicht beeinflusst. Diese SH-Verbindung übt auch noch keinen Einfluss auf die aktivierende Wirkung des Mn-Ions aus (Tabelle V). Erythrocyten von Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege und Ratte zeigten, entgegen den von Menschen, Schwein und Rind, fast keine Argininspaltung, auch nicht einmal nach Mn-Aktivierung (Tabelle VI). Das stimmt im grossen und ganzen mit der

Angabe von Edlbacher (1927) überein. Nach dem Arginasegehalt der Erythrocyten kann man also die untersuchten Tiere scharf in zwei Gruppen einteilen. Es ist aber noch eine Frage, ob jene Arten Erythrocyten, die an sich das Arginin nicht spalten können, durch irgendeinen Zusatz entmaskt und zur Argininhydrolyse fähig gemacht werden. Aus dieser Erwägung wurde der Einfluss des Eisenoxydulsulfats, Nickelsulfats, Cobaltehlorürs und Glutathions untersucht, aber die ursprünglich fast inaktiven Kaninchenerthyrocyten konnten dadurch nicht als arginasehaltig anerkannt werden (Tabelle VII).

Die vorliegende Methode der Arginasebestimmung hat, wie oben erwähnt, mit dem präformierten oder enzymatisch gebildeten Harnstoff nichts zu tun, daher kann man auch diese Methode ohne weiters zur Prüfung der Beeinflussbarkeit der Arginase durch grosse Mengen des Harnstoffes anwenden. Gross (1920) hat bei dem Versuch mit Lebersuspension den Einfluss des Harnstoffes und Ornithins auf die Argininspaltung untersucht. Sein Versuch wurde bei Neutralreaktion ausgeführt und die Argininspaltung wurde nach 24 Stunden mittels Formoltitration gemessen. An solcher Versuchsanordnung kann man die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass die Autolyse der Lebersuspension selbst, die auch eine Zunahme der formoltitrierbaren NH₂-Gruppe verursacht und deren Betrag durch äussere Zusätze verschieden zu beeinflussen ist, ohne Rücksicht in Rechnung eingezogen wird. Das mit meiner Methode an Erythrocytenarginase erworbene Resultat war aber ganz übereinstimmend mit dem von Gross, dass die Arginase durch Harnstoff nicht, aber durch Ornithin deutlich gehemmt wird (Tabelle VIII u. IX). Die 3 fach konzentriertere Harnstoffmenge als das primär vorhandene Arginin übte auch keinen Einfluss auf die Spaltung des Arginins aus (Tabelle X). Bei dem Versuch mit dem Ornithinzusatz muss man selbstverständlich darauf achten, dass die Endkonzentration des Ornithins in der Versuchslösung sowohl am Anfang des Versuchs als auch während der Argininhydrolyse so verdünnt bleibt, dass es überhaupt nicht als Flavianat gefällt wird, weil meine Argininbestimmung auf Kolorimetrie der Flaviansäure beruht. Auch das berücksichtigend konnte ich bei

meiner Versuchsanordnung Ornithin dem Arginin in gleich konzentrierter Menge zusetzen, weil das Ornithin in solcher und auch noch doppelt gesteigerter Konzentration bei der Kolorimetrie keine merkliche Verfärbung verursachte und auch bei dem Versuch mit Ornithin gleich nach dem Ansetzen der Probe genau 100% Arginin kolorimetrisch wieder gefunden werden konnte.

Die Haltbarkeit der Erythrocytenarginase wurde dann untersucht. Die Herstellungsweise der Organarginaselösung durch vorangehende Autolyse des Organbreis und nachfolgende Dialyse des Autolysats in Betracht ziehend, wurden die Versuche wie folgt ausgeführt. Aufgelöste Erythrocyten wurden in zwei Portionen geteilt. An einer Hälfte wurde die Arginasebestimmung sogleich gemacht. Die andere Hälfte wurde zwei Tage unter Chloroform und Toluolzusatz bei 37° aufbewahrt und von dem währenddessen entstandenen Niederschlag abfiltriert, dann zwei Tage gegen Wasser dialysiert. In der Lösung aus verschiedenen Blutproben war Arginase noch wohl nachzuweisen, aber diese Behandlung verursachte in jedem Fall mehr oder weniger Abschwächung der Fermentaktivität, weil auch bei den Versuchsproben mit Mn-Zusatz endlich niemals solche Argininspaltung wie durch die entsprechende unbehandelte Erythrocytenlösung erzielt werden konnte (Tabelle XI).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass bei den Tieren mit starker Blutarginase die einfach nach Entblutung herausgenommenen Organe ausser der eigentlichen Organarginase noch die vermischte Blutarginase enthalten und selbst nach der Autolyse und Dialyse nicht von dieser Blutarginase befreit werden können. Aber man darf im umgekehrten Sinne, dass die in Organen nachzuweisende Arginase nicht anders als das vermischte Blutferment sei, nicht annehmen, weil, wie in voriger Mitteilung berichtet, sowohl die frischen Organsuspensionen von den Tieren, z. B. Kaninchen, dessen Blut praktisch von Arginase frei ist, wie ihre autolysierten und dann dialysierten Lösungen eine kräftige Hydrolyse des Arginins auszuüben im stande waren.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Argininmonohydrochlorid wurde, wie in voriger Mitteilung angegeben, aus Gelatine hergestellt.

Blutentnahme wie üblich, dabei wurden 9 Teile Blut in dem 20 cem Spritzenzylinder mit 1 Teil 2% Kaliumoxalat in physiologischer Kochsalzlösung gut gemischt. Aus diesem Oxalatblut wurde das Plasma getrennt und die abgeschleuderten Erythrocyten wurden nach einmaligem Waschen mit physiologischer Salzlösung zu ursprünglichem Blutvolumen mit Wasser verdünnt; diese letztere Lösung wird einfach als Erythrocytenlösung genannt.

Puffer war *M*/10 Glykokoll-NaOH wie in voriger Mitteilung.

Zusammensetzung der Versuchslösung war wie folgt.

	ohne Mn	mit Mn
<i>M</i> /10 Argininmonohydrochlorid	2.0 cem	2.0 cem
<i>M</i> /10 Natronlauge	1.0 „	1.0 „
Puffer	3.0 „	3.0 „
<i>M</i> /100 MnSO ₄	0 „	1.0 „
Wasser	2.0 „	1.0 „
Fermentlösung	2.0 „	2.0 „

Versuchstemperatur 37°, PH des Hydrolysengemisches 8.9, und die Versuchsdauer 1 Stunde. Die Endkonzentration des Arginins war in jedem Fall anfänglich *M*/50. Kolorimetrische Argininbestimmung wurde sofort nach dem Ansetzen der Versuche und nach 1 Stunde an 3.0 cem Versuchslösung ausgeführt. Über die Ausführung der Bestimmung siehe vorige Mitteilung (1936). Während des Experiments habe ich gefunden, dass zur Enteiweisung der Versuchslösungen 5% Metaphosphorsäure weit besser ist als 8% Trichloressigsäure, weil aus dem Filtrat der Metaphosphorsäurefällung das Argininflavianat direkt ohne vorheriger Kaolinbehandlung und auch noch schneller ausgeschieden werden kann. Bei vorliegenden Versuchen habe ich aber jene frühere Methode gebraucht. Aus der gefundenen Argininmenge wurde die abgebauten Menge und dann das hydrolytische Prozent berechnet. In den nachfolgenden Tabellen sind einfachheitshalber meistens nur die so berechneten %-Zahlen angegeben. 1-2% negative Hydrolyse bedeuten.

1. *Arginase in Menschen-, Schweine- und Rinderblut.*

TABELLE I.

	Blut		Hämolierte Erythrocyten	
	ohne MnSO ₄	mit MnSO ₄	ohne MnSO ₄	mit MnSO ₄
Menschen	2.0%	20.6%	10.1%	40.0%
Schwein	9.0 "	21.0 "	22.5 "	59.1 "
Rind	5.8 "	17.0 "	21.0 "	75.0 "
"	3.8 "	18.8 "	21.0 "	72.0 "

2. *Weitere Versuche über Mn-Aktivierung der Erythrocytenarginase.*

TABELLE II.

Nr.	Menschen		Schwein	
	ohne Mn	mit Mn	ohne Mn	mit Mn
1	4.8%	23.1%	21.0%	54.0%
2	8.8 "	40.1 "	28.0 "	58.2 "
3	9.8 "	47.0 "	17.4 "	45.7 "
4	5.1 "	40.2 "	11.2 "	38.1 "
5	12.1 "	45.0 "	22.0 "	41.3 "
6	6.0 "	31.7 "		
7	4.8 "	37.0 "		
8	3.8 "	27.5 "		
9	8.0 "	33.1 "		

3. *Die Arginasewirkung der Menschensera.*

TABELLE III.

Nr.	Zusatz	Sofort	1 Stde.	24 Std.	Bemerkung
1	ohne MnSO ₄	0 %	1.0%	1.0%	Normal
2	" "	0 "	1.0 "	3.2 "	"
3	" "	1.0 "	1.0 "	2.0 "	Mammakrebs
4	" "	2.0 "	0 "	1.0 "	Uteruskrebs
5	A, ohne MnSO ₄	2.0 "	0 "	0 "	Normal
	B, mit "	0 "	2.0 "	1.0 "	
6	A, ohne MnSO ₄	0 "	3.0 "	2.0 "	
	B, mit "	2.0 "	1.0 "	1.0 "	Magenkrebs

4. *Arginasewirkung der Erythrocyten von Krebskranken.*

TABELLE IV.

	ohne MnSO ₄	mit MnSO ₄
Mammakrebs	6.8%	38.0%
Uteruskrebs	5.9 „	30.6 „

5. *Einfluss des Glutathions auf Erythrocytenarginase des Menschen.*

TABELLE V.

Ohne Glutathion und MnSO ₄	6.5%
Mit 1.0 cem M/100 MnSO ₄	28.0 „
Mit 1.0 cem M/100 Glutathion	7.1 „
Mit 1.0 cem M/100 MnSO ₄ u. 1.0 cem M/100 Glutathion	30.0 „

6. *Nicht nachweisbare Arginase in der Erythrocyten von Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege und Ratte.*

TABELLE VI.

Nr.	Zusatz	Kaninchen	Meerschweinchen	Ziege	Ratte
1	A, ohne Mn	2.0%	2.0%	3.0%	2.0%
	B, mit „	1.0 „	1.0 „	1.0 „	3.8 „
2	A, ohne „	0 „	0 „	2.0 „	0 „
	B, mit „	3.0 „	1.0 „	3.8 „	2.0 „
3	A, ohne „	0 „			
	B, mit „	1.0 „			
4	A, ohne „	3.0 „			
	B, mit „	2.0 „			

7. Keine Aktivierung der Erythrocytenargininase der Kaninchen durch verschiedene Zusätze.

TABELLE VII.

Ohne Zusatz	2.0%
Mit 1.0 cem $M/100$ $FeSO_4$	0 „
Mit 1.0 „ $M/100$ $NiSO_4$	3.0 „
Mit 1.0 „ $M/100$ $CoCl_2$	1.0 „
Mit 1.0 „ $M/100$ Glutathion	2.0 „

8. Einfluss des Harnstoffes auf Erythrocytenargininase vom Menschen und Schwein.

Zu diesem Versuch wurden die Ansätze folgender Zusammensetzung bereitet.

TABELLE VIII.

		a	b	c	d
$M/10$ Argininmonohydrochlorid		2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem
$M/10$ Natronlauge		1.0 „	1.0 „	1.0 „	1.0 „
$M/10$ Glykokollnatronpuffer		2.0 „	2.0 „	2.0 „	2.0 „
$M/10$ Harnstoff		0	0	2.0 „	2.0 „
$M/100$ $MnSO_4$		0	1.0 „	0	1.0 „
Wasser		3.0 „	2.0 „	1.0 „	0
Fermentlösung		2.0 „	2.0 „	2.0 „	2.0 „
Bei Menschen- erythro- cyten	Gefundenes Arginin	sofort { 1 Stde. 1.72 mg 1.64 „	1.74 mg 1.13 „	1.71 mg 1.66 „	1.72 mg 1.11 „
	Hydrolyse	6.0%	35.1%	4.8%	36.0%
Bei Schweine- erythro- cyten	Gefundenes Arginin	sofort { 1 Stde. 1.71 mg 1.35 „	1.72 mg 0.71 „	1.74 mg 1.39 „	1.74 mg 0.68 „
	Hydrolyse	22.5%	59.1%	19.9%	61.0%

9. Einfluss des Ornithins auf Erythrocytenargininase vom Menschen und Schwein.

Ornithin wurde nach Schulze und Winterstein (1898) aus

Argininmonohydrochlorid über Ornithursäure als Di-hydrochlorid hergestellt. Seine Analyse war wie folgt.

Analyse: $C_5H_{12}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (205.06)

	Berechnet	Gefunden
N,	13.66%	13.64%
Cl,	34.58%	34.91%

Zusammensetzung der Versuchslösung war wie folgt:

TABELLE IX.

	a	b	c	d	
M/10 Argininmonohydrochlorid	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem	
M/10 Natronlauge	1.0 „	1.0 „	0	0	
M/10 Glykokollnatronpuffer	2.0 „	2.0 „	2.0 „	2.0 „	
M/100 MnSO ₄	0	1.0 „	0	1.0 „	
M/10 Ornithindihydrochlorid	0	0	2.0 „	2.0 „	
M/2.5 Natronlauge	0	0	1.0 „	1.0 „	
Wasser	3.0 „	2.0 „	1.0 „	0	
Fermentlösung	2.0 „	2.0 „	2.0 „	2.0 „	
Bei Menschen- erythro- cyten	Gefundenes Arginin { sofort 1 Stde.	1.74 mg 1.57 „	1.72 mg 1.05 „	1.71 mg 1.64 „	1.72 mg 1.30 „
	Hydrolyse	10.1%	40.0%	6.1%	25.5%
Bei Schweine- erythro- cyten	Gefundenes Arginin { sofort 1 Stde.	1.69 mg 1.39 „	1.74 mg 0.78 „	1.72 mg 1.47 „	1.72 mg 1.06 „
	Hydrolyse	20.0%	55.4%	15.5%	39.0%

10. Einfluss des Harnstoffes auf Leberarginase des Schweines (bei PH 9.2).

TABELLE X.

	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem
M/10 Argininmonohydrochlorid	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem	2.0 cem
M/10 Natronlauge	1.0 „	1.0 „	1.0 „	1.0 „
Puffer	2.0 „	2.0 „	2.0 „	2.0 „
M/5 Harnstoff	0	1.0 „	2.0 „	3.0 „
Wasser	3.0 „	2.0 „	1.0 „	0
Fermentlösung	2.0 „	2.0 „	2.0 „	2.0 „
Arginin Spaltung	65.2%	64.3%	67.3%	65.8%

11. *Abschwächung der Erythrocytenargininase beim Aufbewahren und Dialysieren.*

TABELLE XI.

	Erythrocytenlösung			
	vor Autolyse		nach Autolyse und Dialyse	
	ohne Mn	mit Mn	ohne Mn	mit Mn
Menschen	9.8%	47.0%	1.0%	17.6%
"	12.1 „	45.2 „	3.0 „	21.0 „
Schwein	21.0 „	54.0 „	3.0 „	18.1 „
"	28.3 „	58.1 „	4.8 „	16.7 „
Rind	21.0 „	75.0 „	4.8 „	34.1 „
"	21.0 „	72.0 „	6.8 „	39.0 „

LITERATUR.

Edlbacher, S., Krause, F. u. Merz, K. W. (1927): Z. physiol. Chem., **170**, 68.
 Edlbacher, S. u. Röther, H. (1925): Z. physiol. Chem., **148**, 264.
 Gross, R. E. (1920): Z. physiol. Chem., **112**, 236.
 Haddow, A. (1931): Lanceet, **1**, 1021.
 Iwabuchi, T. (1936): J. of Biochem., **24**, 447.
 Kossel, A. u. Dakin, H. D. (1904): Z. physiol. Chem., **41**, 321.
 Kossel, A. u. Dakin, H. D. (1904): Z. physiol. Chem., **42**, 181.
 Kossel, A. u. Gross, R. E. (1924): Z. physiol. Chem., **135**, 167.
 Schulze, E. u. Winterstein, E. (1898): Z. physiol. Chem., **26**, 1.
 Weil, L. u. Russell, M. A. (1934): J. biol. Chem., **106**, 505.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER FETTSÄURE- OXYDATION IM TIERKÖRPER.

VON

SYUNITIRŌ YOSII.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät
der Kaiserlichen Kyushu-Universität zu Fukuoka, Japan.

Direktor: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Eingegangen am 1. Juli 1937.)

A. Über die Dehydrogenase von höheren Fettsäuren.

I. EINLEITUNG.

Während die gesättigten Fettsäuren im allgemeinen *in vitro* schwer angreifbar sind, werden sie *in vivo* sehr leicht und zwar vollständig oxydiert, und es entstehen zuletzt als ihre Spaltprodukte Kohlensäure und Wasser. Aber die intermediär entstandenen Spaltprodukte sind sehr labil und erleiden sofort weitere Veränderungen, so dass man die Oxydationsvorgänge nicht erkennen kann, die die Fettsäuren dabei erleiden.

F. Knoop (1905) führte einen Tierversuch mit Phenylderivaten der Fettsäuren durch und kam zu dem Schluss, dass bei der Oxydation von Fettsäuren das C-Atom in β -Stellung anfangs angegriffen wird. Diese Annahme ist die bekannte β -Oxydationstheorie. G. Embden und F. Kalberlah (1906) führten den Perfusionsversuch mit Fettsäuren durch, H. D. Dakin (1908) führte *in vitro* einen Versuch über die Fettsäureoxydation durch, und beide stimmten der β -Oxydationstheorie von Knoop zu. Dem Mechanismus der β -Oxydation wurde durch eine grosse Zahl von Untersuchungen nachgegangen. Nach der H. Wieland'schen Dehydrierungstheorie (1922) entsteht die $\alpha\beta$ -ungesättigte Fettsäure infolge von Entweichung der zwei H-Atome und weiter durch Oxydation zu einer niederen Fettsäure mit Verlust von zwei C-Atomen. Wenn dabei ein Molekül Wasser zur ungesättigten Fett-

säure zugesetzt wird, entsteht die β -Oxyfettsäure, die sich weiter durch Oxydation zu Ketosäure verändert. Fermentativ studierte zuerst T. Thunberg (1920) die Fettsäureoxydation; er bestätigte, dass nach seiner Methylenblauentfärbungsmethode die niedere Fettsäure dehydrogenetisch oxydiert wird. Seitdem bestätigten manche Forscher diese Tatsache. H. D. Dakin (1922) und H. Wieland (1922) vermuteten, dass die dehydrogenetische Oxydation im Sinne von Wieland bei den höheren Fettsäuren stattfinden muss.

Experimentell bestätigten H. Tangl und N. Berend (1930, 1931, 1933) dies zum ersten Mal. Neuerdings bewiesen G. Quagliariello (1932), J. H. Quastel und A. H. M. Wheatley (1933), A. Cimmino und F. P. Mazza (1933) und G. Stolfi und F. P. Mazza (1933) die dehydrogenetische Oxydation von höheren Fettsäuren in tierischen Geweben. Verf. hat die Dehydrogenase von höheren Fettsäuren dargestellt und ihre Eigenschaften, Kinetik und Oxydierbarkeit bei verschiedenen Fettsäuren studiert.

II. DIE AKTIVITÄT DER FETTSÄUREDEHYDROGENASE IN VERSCHIEDENEN ORGANEN.

Tangl und Berend bestätigten die Anwesenheit von Fettsäureoxydase in Pankreas, Galle und Leber, Quagliariello in Galle und Fettgewebe, Cimmino und Mazza in *B. coli*, Mazza in Niere aber nicht in Muskel und Duodenalschleimhaut.

Das frische Organgewebe, das von Blut befreit war, hat Verf. möglichst klein zerschnitten, eine bestimmte Menge abgewogen und im Mörser mit Seesand zerrieben. Der so behandelten Gewebsmasse wurde eine berechnete Menge $M/15$ Phosphatpuffer ($\text{pH}=7.5$) zugesetzt und schliesslich ein 10%iger Gewebebrei erhalten. 2.0 ccm dieses Breies wurde in eine Thunbergsche Vakuumröhre abpipettiert; dazu wurden je 1.0 ccm $M/50$ Fettsäure (Stearinsaures Na, Palmitinsaures Na) und 0.5 ccm $M/10000$ Methylenblaulösung (bisweilen $M/5000$) zugesetzt. Dann wurde die Röhre mittels der Vakuum-Pumpe 3 Minuten lang evakuiert, in den Thermostaten von 37°C eingetaucht und der Zeitverlauf vom Moment des Eintauchens bis zur vollständigen Entfärbung

des Mbs gemessen. Da es schwer ist, das Fettgewebe zu Brei zu zerreiben, brauchte Verf. fein zerschnittenes Fettgewebe; dazu wurde $M/15$ Phosphatpuffer ($\text{pH}-7.5$) 2.0 ccm, $M/10000$ Mb 0.5 ccm und $M/50$ Fettsäure 1.0 ccm zugesetzt. Als Kontrolle brauchte Verf. ein Reaktionsgemisch, das die gleiche Menge Aqua destillata anstatt der Fettsäure enthielt. Aus diesen Versuchsergebnissen (Tabelle I) ist zu schliessen, dass die Entfärbungszeit im Fettgewebe deutlicher, in Leber und Pankreas dagegen schwach verkürzt ist. (Die Aktivität ist nach der Formel von Thunberg (1921) berechnet, nämlich $I=100(1/A-1/B)$. A ist die vollständige Entfärbungszeit bei Anwesenheit von Fettsäure, B bei Abwesenheit von Fettsäure).

TABELLE I.

Die Aktivität der Fettsäuredehydrogenase in verschiedenen Organen.
(Aktivität $I=100(1/A-1/B)$).

Organ	Aktivität	
	Stearinsäure	Palmitinsäure
Fettgewebe	7.355	9.156
Leber	2.673	4.994
Pankreas	2.819	2.856
Nebenniere	0.525	0.672
{ Rinde Mark	0.109	0.484
	0.495	0.481
Dünndarmschleimhaut	0.285	0.035
Niere	0.490	0.318
Herz	0.186	0.042
Magenschleimhaut	0.087	0.263
Muskel	0.085	0.172
Gehirn	0	0
Milz	0	0
Hoden	0	0
Ovarium	0	0
Uterus	0	0
Plazenta	0	0

Anhang:

F. Grande (1934) bestätigte das Vorkommen von Dehydrogenase der höheren Fettsäuren im pflanzlichen Gewebe. Verf. prüfte diese Tatsache nach und bestätigte ihre Existenz. Das Verfahren war ganz identisch mit dem oben beschriebenen. Aus Tabelle II ist klar zu ersehen, dass die Fettsäuredehydrogenase in Sojabohnen deutlich und in Mungobohnen und schwarzen Bohnen schwach vorhanden ist.

TABELLE II.

Die Aktivität der Fettsäuredehydrogenase in pflanzlichen Geweben.

Material	Aktivität (Donator; Stearinsäure)
Sojabohnen	6.856
Mungobohnen	2.272
Schwarze Bohnen	1.801

III. MATERIAL, VERSUCHSMETHODIK UND DARSTELLUNG DER FETTSÄUREDEHYDROGENASE.

Verf. brauchte hauptsächlich das Unterhautfettgewebe vom Rind, bisweilen das Mesenterial- und Perirenal-fettgewebe und zwar stets innerhalb 3–5 Stunden nach dem Schlachten. Die H-donatoren, z. B. Stearin- und Palmitinsäure wurden als *M*/50 Lösung von Natriumsalz angewandt und falls das Natriumsalz von Fettsäure nicht erreichbar ist, wurde es mit *M*/25 NaOH zu *pH* 7.5 neutralisiert und gebraucht. Die Versuchsmethodik wurde nach der Thunbergschen Methylenblauentfärbungsmethode durchgeführt; das Reaktionsgemisch bestand aus 3.0 ccm Fermentlösung, 0.5 ccm *M*/10000 Mb-Lösung und 1.0 ccm H-Donator. Als Kontrolle diente die gleiche Menge Aqua destillata an Stelle der Fettsäure. Nach Abpipettierung des Reaktionsgemisches in die Thunbergsche Röhre evakuiert man 3 Minuten lang mittels der Vakuum-Pumpe, taucht es in den Thermostat von 37°C und misst den Zeitverlauf vom Augenblick des Eintauchens bis zur völligen Entfärbung des Mbs.

Darstellung der Fermentlösung:—Wenn das Fettgewebe frisch angewandt wird, wirkt die darin enthaltene Fettsäure als Donator, so dass die Entfärbungszeit im Verhältnis zum Kontrollversuch ziemlich kurz ist. Verf. behandelte das Fettgewebe im Soxletschen Apparat mit Äther, um es vom Fett zu befreien, prüfte die dehydrogenetische Wirkung des Rückstandes und bestätigte die Abschwächung der Dehydrogenase durch Ätherbehandlung und ein Überbleibsel von Fettsäure im Fettgewebe. (Tabelle III).

TABELLE III.

Material	Entfärbungszeit		
	Stearinsäure	Palmitinsäure	Kontrolle
Frisches Fettgewebe	5'43"	5'11"	9'52"
mit Äther 1 Stunde behandelt	17'40"	15'40"	24'40"
mit Äther 2 Stunden behandelt	28'30"	27'15"	35'45"
weiter mit Alkohol od.			
Petroleumäther behandelt	60'(-)	60'(-)	60'(-)

Wenn das so behandelte Fettgewebe weiter mit Petroleumäther oder mit Alkohol behandelt wurde, wurde die Dehydrogenase ganz zerstört.

Ferner wurde das frische Fettgewebe nach Entfernung des Blutes zerschnitten, eine bestimmte Menge abgewogen und nach Zusatz einer berechneten Menge von Extraktionsmitteln geknetet; es wurden nämlich 1.0 ccm Extraktionsmittel zu 2.0 g Fettgewebe und Toluol bis zu 1% zugefügt, durch ein Tuch filtriert, das Filtrat abzentrifugiert, das obenauf schwimmende Fett entfernt und eine gelblich getrübte Flüssigkeit gewonnen. Verf. brauchte diese Lösung als Fermentlösung. Tabelle IV zeigt deutlich, dass unter einigen Extraktionsmitteln der Phosphatexakt am stärksten, dann der Reihe nach Ammoniak, Na-Azetat und Borsäure schwächer sind. Früher bestätigte Thunberg, dass durch Zusatz von Borsäure die Entfärbungszeit der niederen Fettsäuren ziemlich verlängert wird. Verf. bestätigte dies auch bei höheren Fettsäuren. Das Unterhaut-, Mesenterial-, und Perirenal-fettgewebe vom gleichen Rind wurde als Material angewandt. Das Unterhautfettgewebe war am

stärksten an dehydrogenetischer Wirkung. (Tabelle V).

TABELLE IV.
Extraktion der Fettsäuredehydrogenase mittels verschiedener
Extraktionsmittel.

Extraktionsmittel	pH	Aktivität
M/15 Phosphatpuffer	7.5	19.54
M/10 NH ₄ Cl + M/10 NH ₃	7.5	13.64
Natrium-Azetatlösung	7.5	12.00
M/20 Borax + M/10 HCl	7.5	11.05

TABELLE V.
Verbreitung dieser Dehydrogenase in einigen Fettgeweben.

Fettgewebe	Aktivität		
	I	II	III
Unterhaut	17.75	19.80	18.01
Mesenterial	5.92	5.78	7.89
Perirenal	5.73	4.26	4.73

Ferner extrahierte Verf. mit verschiedenen Konzentrationen von Phosphatpuffer der gleichen H-Ionenkonzentration (pH=7.5): das Ferment wurde am besten von der Konzentration M/15 bis M/45 extrahiert (Tabelle VI). Ausserdem führte Verf. die Adsorptionsmethode mit Kaolin und Alumina durch, um dieses Ferment zu reinigen, aber ohne Erfolg. Bei den folgenden Versuchen brauchte Verf. die oben beschriebene Darstellungsmethode.

TABELLE VI.
Extraktion dieser Dehydrogenase mittels verschiedener
Konzentration des Phosphatpuffers.

Phosphatkonzentration	pH	Aktivität
M/2	7.5	2.058
M/5	7.5	7.626
M/15	7.5	15.498
M/30	7.5	15.385
M/45	7.5	15.498
M/100	7.5	11.049

IV. ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN DER FETTSÄURE-DEHYDROGENASE.

Diese Fermentlösung ist gelblich halbgetrübt und zeigt die unten erwähnten Reaktionen:

A. *Eiweissreaktion*:—Biuret R. (+), Xanthoprotein R. (+), Millonsche R. (+), Hopkins-Colesche R. (+), α -Naphthol-Hypochlorit R. (+), Schwefelblei R. (+), Molischsche R. (+), Nitroprussid R. (—). Durch Zusatz von Sulfosalicyl- und Trichloressigsäure entsteht weisser Niederschlag.

B. *Fettreaktion*:—Acrolein R. (—).

Cholesterin: Salkowskische R. (—), Liebermann-Burchardsche R. (—), Windaussche R. (—).

Lezithin: Cadmiumchlorid R. (—).

C. *Kohlenwasserstoffreaktion*.

Trommer, Fehling, Benedict, Barfoed und Nylander R. (—).

Seliwanoff, Phloroglucin, Orcin u. Essigsäure-Anilin R. (—).

Der Fettgehalt dieser Dehydrogenase wurde durch die Bloorsche Methode (1914), der Eiweissgehalt durch die Bangsche Mikrokjeldahlmethode (1920) bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle VII.

TABELLE VII.
Fett- und Eiweissgehalt dieser Dehydrogenase.
(Fermentlösung: 1.0 ccm)

Versuchsnummer	Fett in mg	Eiweiss in mg
1	2.2531	2.9938
2	2.1285	4.1969
3	2.0803	3.0606
4	0.9578	3.2331
5	1.6612	2.5100
Mittelwert	1.6162	3.1989

Nach einstündiger Dialyse mittels Elektrodialysenapparat nach Pauli verglich Verf. die dehydrogenetische Wirkung, aber

es wurde keine nennenswerte Abschwächung wahrgenommen, solange die Phosphatkonzentration nicht auffallend abgenommen hatte.

V. ÜBER DIE KINETIK DER FETTSÄUREDEHYDROGENASE.

A. Der Einfluss der Fettsäurekonzentration.

Bei Untersuchungen über die Wirkung der Dehydrogenase spielt der Einfluss der Konzentration des H-Donators eine grosse Rolle. J. Toyama (1933) bestätigte bei der Xanthinoxidase, dass die Reaktionsgeschwindigkeit langsamer wird, wenn die Konzentration des H-Donators eine bestimmte Grenze überschreitet. Verf. hat mittels seiner Mb-Methode einige Versuche mit verschiedenen Fettsäurekonzentrationen vorgenommen. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle VIII.

TABELLE VIII.
Der Einfluss der Fettsäurekonzentration.

Endkonzentration von stearinsaurem Natrium	Entfärbungszeit
<i>M</i> /10	22'15"
<i>M</i> /25	15'45"
<i>M</i> /50	14'15"
<i>M</i> /75	13'13"
<i>M</i> /100	10'28"
<i>M</i> /250	12'48"
<i>M</i> /500	20'28"
<i>M</i> /750	23'15"
<i>M</i> /1000	25'28"

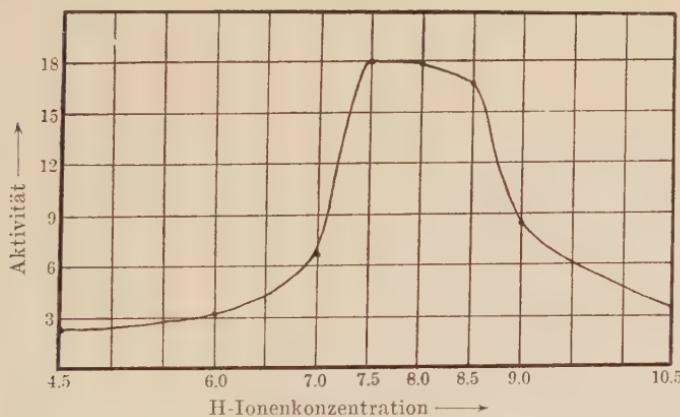
Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei einer Fettsäurekonzentration von *M*/100 die optimale Konzentration liegt, und darüber oder darunter eine Hemmung in der Wirkung der Fett säuredehydrogenase verzeichnet wird.

B. Die optimale H-Ionenkonzentration.

Im allgemeinen wurde das Ferment von der P_{II} stark be-

einflusst; jedes Ferment hat seine besondere optimale H-Ionenkonzentration. Verf. unternahm einige Versuche, die diese Verhältnisse von der Fettsäuredehydrogenase klären sollten. Die H-Ionenkonzentration unter 4.5 wurde von primärem Kaliumphosphat + Salzsäure, über 8.5 von sekundärem Natriumphosphat + Natronlauge angeordnet. Aus Figur I ist zu ersehen, dass die dehydrogenetische Wirkung unter pH 7.0 und über 9.0 immer abgeschwächt ist, und die optimale pH von 7.5 bis 8.0 liegt.

Fig. I.
 pH -Aktivitätskurve.



C. Die optimale Temperatur.

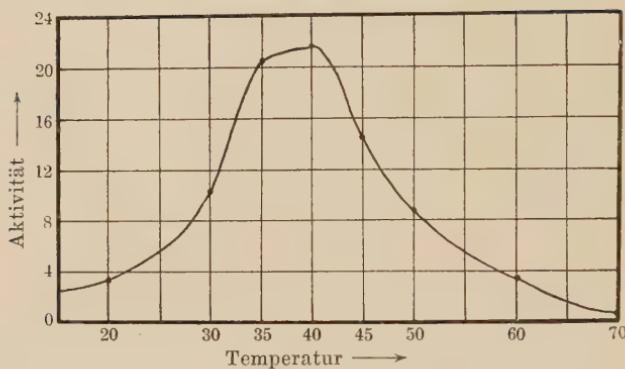
Je höher die Temperatur steigt, desto schneller wird die Reaktionsgeschwindigkeit, aber die Hitze zerstört die Fermentwirkung, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit stark abgeschwächt ist, wenn die Temperatur eine bestimmte Grenze überschreitet. Aus Fig. II ist klar zu erkennen, dass die optimale Temperatur bei 35° bis 40° liegt. Die Fermentwirkung ist darunter und darüber ziemlich abgeschwächt.

D. Der Einfluss von verschiedenen Arzneimitteln.

a) Anorganische Salze.

Phosphat-Ion wirkt, wie oben geschildert, spezifisch aktivierend

Fig. II.
Temperatur-Aktivitätskurve.



auf dieses Ferment. Ausserdem beobachtete Verf. den Einfluss von verschiedenen anorganischen Salzen, nämlich NaCl , KCl , BaCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 und AlCl_3 . Nach Thunberg wird die Dehydrogenase der Froschmuskulatur durch NaCl und KCl ein wenig, durch Phosphat stark aktiviert, dagegen durch Ca , Ba und Sr ziemlich stark gehemmt. Man kann aus Tabelle IX ersehen, dass bei hoher Konzentration alle geprüften anorganischen Salze hemmend wirken, besonders BaCl_2 , MgCl_2 und AlCl_3 . NaCl und KCl haben keinen Einfluss bei der Konzentration von $M/100$ und darunter. Es ist interessant, dass nur CaCl_2 aktivierend wirkt.

TABELLE IX.
Der Einfluss von anorganischen Salzen.

Konz. \ Salz	Entfärbungszeit					
	NaCl	KCl	MgCl_2	BaCl_2	CaCl_2	AlCl_3
0	5'35"	5'25"	8'25"	7'20"	8'15"	9'13"
$M/2$	7'25"	7'10"	—	($M/4$) 72'20"	32'40"	60'(-)
$M/10$	6'40"	6'12"	20'55"	27'30"	12'33"	60'(-)
$M/100$	5'38"	5'28"	10'45"	9'57"	6'45"	11'38"
$M/1000$	5'35"	5'20"	8'45"	7'42"	8'22"	9'13"
$M/10000$			8'30"			9'10"

b) *Organische Substanzen.*

Verf. untersuchte den Einfluss von Oxal-, Citronen-, Gallensäure (Taurocholsäure und Glykocholsäure), Glykokoll und Eieralbumin auf diese Dehydrogenase. Tabelle X zeigt, dass die Citronensäure keinen Einfluss hat, die Oxalsäure und das Glykokoll hemmend und die Gallensäure und das Albumin fördernd wirken.

TABELLE X.
Der Einfluss von organischen Substanzen.

Na-citrat		Glykokoll		Na-Oxalat	
Konz.	Entf.-Zeit	Konz.	Entf.-Zeit	Konz.	Entf.-Zeit
0	5'26"	0	5'25"	0	4'30"
<i>M</i> /10	5'35"	<i>M</i> /3	6'45"	<i>M</i> /25	6'37"
<i>M</i> /50	5'20"	<i>M</i> /15	6'55"	<i>M</i> /100	6'33"
<i>M</i> /250	5'20"	<i>M</i> /75	6'10"	<i>M</i> /1000	6'23"
<i>M</i> /1250	5'30"	<i>M</i> /375	5'45"	<i>M</i> /10000	4'30"
<i>M</i> /6250	5'30"	<i>M</i> /1875	5'35"	<i>M</i> /100000	4'30"

Konz.	Entfärbungszeit		Eieralbumin	
	Na-Taurocholat	Na-Glykocholat	Konz.	Entf.-Zeit
0	8'10"	7'38"	0	4'38"
<i>M</i> /100	7'50"	7'40"	1%	3'32"
<i>M</i> /200	6'13"	7'25"	0.1%	4'03"
<i>M</i> /500	5'53"	6'37"	0.01%	4'35"
<i>M</i> /1000	5'53"	6'55"	0.001%	4'40"
<i>M</i> /10000	8'13"	7'35"		

Bei Lipase studierte R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz (1923) den Einfluss von Gallensäure und Albumin und vermutete, dass durch Zusatz von Gallensäure bei alkalischem Medium ein kolloidaler Niederschlag mit Eiweiss entsteht und an seiner Oberfläche das Ferment und Substrat gleichzeitig adsorbiert wird, so dass die Reaktion fördernd wirkt. Es ist interessant, dass CaCl_2 , Gallensäure und Albumin, wie auf Lipase, auch auf die Fettsäuredehydrogenase aktivierend wirken. Bekanntlich setzt

die Gallensäure die Oberflächenspannung herab und löst die Fettsäure auf. Aber es ist noch zu studieren, ob die Fettsäuredehydrogenase infolge von Herabsetzung der Oberflächenspannung und Vermehrung der Löslichkeit der Fettsäure aktiviert wird oder auf Grund der Willstätter und Waldschmidt-Leitz'schen Theorie.

c) *Schwermetalle.*

Im allgemeinen inaktivieren die Schwermetalle die Fermentwirkung. Unter einigen untersuchten Schwermetallen, nämlich AgNO_3 , HgCl_2 , CuSO_4 , ZnCl_2 , Pb-Azetat, FeCl_3 , NiSO_4 , CoSO_4 und CdSO_4 ist bei AgNO_3 , HgCl_2 und CuSO_4 die hemmende Wirkung, wie Tabelle XI zeigt, besonders ausgeprägt.

TABELLE XI.
Der Einfluss von Schwermetallen.

Konz.	Salz	Entfärbungszeit							
		AgNO_3	HgCl_2	CuSO_4	ZnCl_2	Pb-azetat	FeCl_3	NiSO_4	CoSO_4
0		6'17"	7'27"	7'47"	6'13"	5'15"	5'35"	5'35"	5'25"
$M/10$		60'(-)	($M/50$)	($M/20$)	60'(-)	60'(-)	60'(-)	60'(-)	60'(-)
				60'(-)	60'(-)				
$M/100$		60'(-)	60'(-)	60'(-)	17'50"	6'05"	60'(-)	8'55"	15'55"
$M/1000$		60'(-)	60'(-)	60'(-)	9'33"	5'25"	7'00"	7'20"	5'35"
$M/10000$		11'00"	60'(-)	60'(-)	7'17"	5'10"	5'25"	5'25"	5'30"
$M/100000$		7'43"	11'23"	25'20"	6'08"		5'30"		5'30"
$M/1000000$		6'20"	7'30"	7'33"					

d) *Die Säure und Alkali.*

Um den Einfluss von Säure und Alkali zu beobachten, führte Verf. die unten erwähnten Versuche aus. Salzsäure oder Natronlauge von bestimmter Konzentration wirkt 30 Minuten lang bei 37°C auf die Dehydrogenase; danach neutralisiert das Reaktionsgemisch zu pH 7.5 und untersuchte die dehydrogenetische Wirkung. Aus Tabelle XII ist zu ersehen, dass über $N/50$ das Ferment ganz zerstört wird.

TABELLE XII.
Der Einfluss von Säure und Alkali.
(Säure oder Alkali wirkt 30 Minuten lang bei 37°C)

Konz.	Entfärbungszeit	
	Salzsäure	Natronlauge
0	5'45"	5 25"
N/1000	5'50"	5'20"
N/500	6'25"	6'15"
N/250	7'20"	7'05"
N/100	8'35"	9'35"
N/75	9'40"	11'30"
N/50	96'	59'
N/25	120'(-)	120'(-)
N/10	120'(-)	120'(-)
N	120'(-)	120'(-)

e) Das Eiweissverdauungsferment.

Unter der Annahme, dass das Wesen der Fettsäuredehydrogenase vielleicht, wie schon gesagt, auf seiner Eiweissnatur beruht, beobachtete Verf. nach Einwirkung von Eiweissverdauungsferment auf die Dehydrogenase die Beziehung zwischen der dehydrogenetischen Wirkung und dem Eiweissgehalt der Dehydrogenase. Zuerst untersuchte Verf. die Pepsinwirkung, aber die Dehydrogenase wurde, wie oben erwähnt, bei der optimalen P_{II} von Pepsin beträchtlich abgeschwächt. Da bei Trypsin die optimale P_{II} näher derjenigen der Dehydrogenase liegt, untersuchte Verf. die dehydrogenetische Wirkung nach Trypsineinwirkung. (Tabelle XIII).

TABELLE XIII.
Trypsinwirkung auf die Dehydrogenase.

(1) 25 eem Fermentlösung + 0.5 g Trysin ($P_{II} = 8.5$; $Tem. = 37^\circ C$).

Einwirkungs- Dauer des Trypsins	Entfärbungszeit		Entstandener Amino-N in mg	Hemmungsgrad $\frac{t' - t}{t'} \times 100$
	mit Trypsin	ohne Trypsin		
10'	9'15"	5'40"	0.617	38.74
20'	11'10"	5'20"	0.819	52.24
40'	17'20"	5'45"	0.839	66.83

(2) 25 ccm Fermentlösung + 0.3 g Trypsin (PH - 8.5; Temp. 37°C).

10'	7'15"	6'20"	0.552	12.64
20'	10'30"	6'50"	0.709	34.92
40'	12'35"	6'50"	0.820	44.97

Nachdem 0.5 oder 0.3 g Trypsin auf 25 ccm Dehydrogenase bei PH 8.5 eine bestimmte Zeit gewirkt hatte, verglich Verf. die dehydrogenetische Wirkung und gleichzeitig den Amino-N, der dabei entstand, nach der Van-Slykeschen Methode.

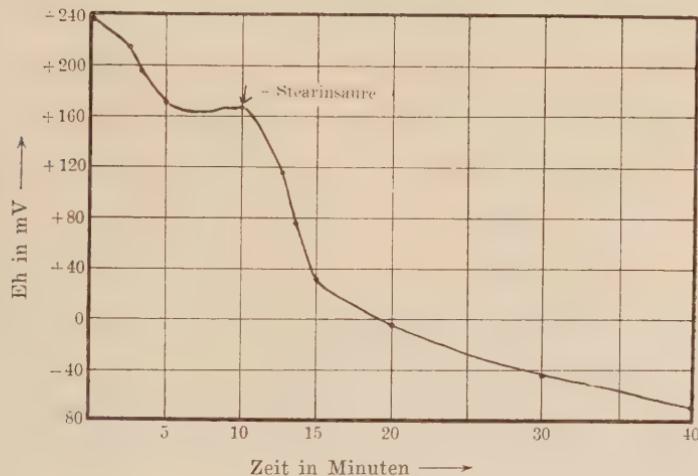
VI. DAS REDOXPOTENTIAL UND DIE JODADDIERUNG.

A. Das Redoxpotential.

Verf. bestätigte, dass die Fettsäure durch das Ferment aus Fettgewebe dehydrogenetisch oxydiert wird. Dabei aktiviert das Ferment die H-Atome in ein Fettsäuremolekül und überträgt es in den H-Akzeptor. Aber es ist noch fraglich, ob diese Aktivierung von H-Atomen bei Abwesenheit von Methylenblau als H-Akzeptor stattfinden muss. K. Kodama (1926) konnte bei frischer Milch oder gereinigtem Ferment (Xanthinoxidase) mit Aldehyd bei Abwesenheit von Mb den potentiometrischen Nachweis nicht erbringen. J. Toyama (1933) führte die potentiometrische Studie über die Schardinger-Reaktion durch und bestätigte, dass gereinigtes Schardingersches Enzym nicht das deutliche Herabsinken des Redoxpotentials durch Zusatz von Acetaldehyd zeigt, dass aber nach Zusatz von Mb das Redoxpotential des Enzyms deutlich sinkt. Verf. wendete ein Vakuumelektrodengefäß nach Kodama und Dixon an, das M. Tsukano (1932) eingehend beschrieb. Als Elektrode brauchte Verf. Platinplatten, als Halbelement eine Quinhydronelektrode, die mit Azetatpuffer von PH 4.62 und einer bestimmten Masse von Quinhydrone-Kristallen angeordnet wurde. 6.0 ccm Fermentlösung und 1.0 ccm $M/5000$ Methylenblau wird in das Elektrodengefäß und 2.0 ccm $M/50$ Fettsäure in die Nebenkammer abpipettiert. Nach vollständiger Evakuierung wird das Gefäß in ein Thermostat von 37°C gehängt, und das Potential mit dem Unipivot-Potentiometer von Cambridge

gemessen. Wenn das Potential konstant wird, wird die Fettsäure aus der Nebenkammer in den Hauptraum gegossen, gut geschüttelt und der zeitliche Verlauf der Potentialverschiebung gemessen. Die Ergebnisse werden in Fig. III gezeigt. Bei Zusatz von Fettsäure zeigt die Reduktionsphase schnelleres und viel tieferes Absinken, wenn Mb zugesetzt wird.

Fig. III.
Das Redoxpotential.



B. Die Jodaddierung.

Nach einer bestimmte Zeit dauernden Einwirkung des Ferments auf Fettsäure bei Anwesenheit von Methylenblau, wird das Jod dem Reaktionsgemisch zugesetzt und die adsorbierte Jodmenge bestimmt. Als Fettsäure verwandte Verf. die gesättigte Fettsäure, so dass die adsorbierte Jodmenge null sein müsste, aber da das Ferment ein wenig ungesättigte Fettsäure enthält, ist das nicht der Fall. Verf. bestimmte die Menge der Jodaddierung von einem Gemisch von Ferment, Fettsäure und Mb vor der Reaktion, brachte dieses System in Vakuum, und nach Mb-Entfärbung tröpfelte er mittels einer Bürette $N/5$ Brom mit Methanol in das Reaktionsgemisch und bestimmte die Menge der Jodaddierung. Der Unter-

schied zwischen beiden Versuchen wird als Addierungsmenge von Jod berechnet. Als Jodmetrie brauchte Verf. die Bromometrie nach H. P. Kaufmann (1926). Das Resultat ist in Tabelle XIV zusammengestellt.

TABELLE XIV.

Fettsäure	Molzahl von Jod addiert zu 1 Mol. Fettsäure.
Stearinsäure	1.04
Palmitinsäure	1.05
Myristinsäure	1.02
Laurinsäure	0.97
Caprinsäure	0.94
Caprylsäure	0.12
Buttersäure	0.08
Propionsäure	0.09

Stearin-, Palmitin-, Myristin-, Laurin- und Caprinsäure absorbieren 1 Molekül Jod per 1 Molekül. Daher entsteht eine einzige Doppelbindung durch Dehydrogenation infolge von Fermentwirkung. Die Jodadsorption der Capryl-, Butter- und Propionsäure ist fast null, so dass diese Säuren von dieser Dehydrogenase nicht oxydiert werden.

VII. DIE OXYDATION VON GESÄTTIGTEN FETTSÄUREN.

Als gesättigte Fettsäuren wendete Verf. Fettsäuren mit der C-Atomzahl 3, 4, 8...16, 18 an. Unter diesen Fettsäuren sind Stearin-(C=18), Palmitin-(C=16), und Myristinsäure (C=14) die besten Donatoren, Laurin-(C=12) und Caprinsäure (C=10) die nächsten, Capryl-(C=8), Butter-(C=4) und Propionsäure (C=3) werden nicht oxydiert. (Tabelle XV). Die Fettsäuren nämlich, deren C-Atomzahl mehr als 10 beträgt, werden durch diese Dehydrogenase oxydiert, darunter aber nicht. M. Powell (1930, 1932) zeigte, dass bei Ratten, die man nur mit Caprinsäure füttert, diese Säure in das Depotfett eingelagert wird, aber nicht

nach Fütterung mit Fettsäuren, deren C-Atomzahl 8 oder darunter beträgt. (auch H. C. Eckstein, 1929) Wahrscheinlich werden die Fettsäuren, deren C-Atomzahl 8 oder darunter beträgt, in dem Verdauungstraktus, z. B. in der Leber, ganz oxydiert und nicht in das Fettgewebe transportiert, so dass das Fettgewebe kein Oxydationsferment gegen diese Säuren besitzt.

TABELLE XV.
Die Oxydation von gesättigten Fettsäuren.

Fettsäuren	Konz.	Aktivität
Stearinsäure $C_{17}H_{35}\cdot COOH$	<i>M/50</i>	21.89
Palmitinsäure $C_{15}H_{31}\cdot COOH$	„	19.17
Myristinsäure $C_{13}H_{27}\cdot COOH$	„	28.30
Laurinsäure $C_{11}H_{23}\cdot COOH$	„	11.32
Caprinsäure $C_9H_{19}\cdot COOH$	„	4.35
Caprylsäure $C_7H_{15}\cdot COOH$	„	0
Buttersäure $C_8H_{17}\cdot COOH$	„	0
Propionsäure $C_2H_5\cdot COOH$	„	0

VIII. DIE OXYDATION VON UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN, FETTSÄUREDERIVATEN UND LIPOIDEN.

Bei der Untersuchung der Fettsäuren mit der Doppelbindung 1, 2 und 3 (Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure) wurde nur die Ölsäure oxydiert. Das von Verf. als Lipoid gebrauchte Cholesterin und Lezithin wurde beides nicht oxydiert. Keine von den Fettsäurederivaten, die Verf. brauchte, d.h. Tristearin, Stearin-säureäthylester, der nach der Methode von P. Duffy (1853) dargestellt wird, und Pentastearylglykose, die nach K. Hess und E. Messmer (1921) dargestellt wird, wurde oxydiert (Tabelle XVI). Verf. suchte die Ursache dieses Verhaltens darin, dass das Molekül von Cholesterin, Lezithin, Tristearin, Stearin-säureäthylester und Pentastearylglykose infolge von Schwerlöslichkeit dieser Substanzen von der Oberfläche des Ferments schwer oder gar nicht adsorbiert werden; wenn das Ferment seine Wirkung zeigen soll, müssen die Donatoren eine freie Carboxylgruppe haben.

TABELLE XVI.
Die Oxydation von ungesättigten Fettsäuren,
Fettsäurederivaten und Lipoiden.

Substrat	Konz.	Aktivität
Ölsäure	M/50.	17.07
Linolsäure	"	0
Linolensäure	"	0
Tristearin	1%	0
Stearinsäureäthylester	"	0
Pentastearylglykose	"	0
Cholesterin	"	0
Lezithin	"	0

IX. DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN KATALASE, LIPASE
UND FETTSÄUREDEHYDROGENASE.

Nach H. Euler (1906) und A. Bach (1905) hat das Fettgewebe Katalase. Verf. hat die Fettsäuredehydrogenase von Unterhaut-, Mesenterial- und Perirenalfettgewebe vom gleichen Rind dargestellt und die Katalasewirkung verglichen. Beim Rind ist die dehydrogenetische Wirkung und die Katalasewirkung im Unterhautfettgewebe am stärksten und schwächer in Mesenterial- und Perirenalfettgewebe. (Tabelle XVII). Es ist auch bekannt, dass das Fettgewebe Lipase enthält. Verf. untersuchte die lipolytische Wirkung der Dehydrogenase, aber mit negativem Erfolg.

TABELLE VII.
Die Beziehungen zwischen Katalase, Lipase und Dehydrogenase.

Material		Aktivität der Dehydrogenase	Reaktionskonstante der Katalase
Rind	Unterhaut	17.55	5.53×10^{-3}
	Mesenterial	5.92	$5.28 \times$ „
	Perirenal	5.73	$5.10 \times$ „
Rind	Unterhaut	19.80	5.69×10^{-3}
	Mesenterial	5.76	$5.02 \times$ „
	Perirenal	4.26	$5.46 \times$ „
Rind	Unterhaut	18.01	5.31×10^{-3}
	Mesenterial	7.89	$4.49 \times$ „
	Perirenal	4.72	$3.80 \times$ „

X. DIE EINIGKEIT DER FETTSÄUREDEHYDROGENASE.

Es ist interessant zu bestimmen, ob die oxydierbare Fettsäure von einem einzelnen Ferment oder verschiedenen Fermenten dehydrogeniert wird. Sind zwei Donatoren gleichzeitig in ihrer optimalen Konzentration vorhanden und werden sie durch ein einziges Ferment dehydrogeniert, so ist die Entfärbungszeit des Mbs dieselbe, als wenn nur der stärkere Donator vorhanden wäre. Aber wenn beide Donatoren durch zwei verschiedene Fermente beeinflusst werden, so ist die Entfärbungszeit kürzer als die, welche der stärkere Donator allein zeigt. (E. Rosling. 1924). Verf. untersuchte dieses Verhältnis bei Stearin-, Palmitin- und Ölsäure und beobachtete keine nennenswerte Verkürzung der Entfärbungszeit, ganz gleichgültig ob diese drei Fettsäuren gleichzeitig vorhanden waren oder nur eine davon. Daher müssen diese drei Fettsäuren durch ein einzelnes Ferment oxydiert werden. (Tabelle XVIII).

TABELLE XVIII.
Die Einzigkeit der Fettsäuredehydrogenase.

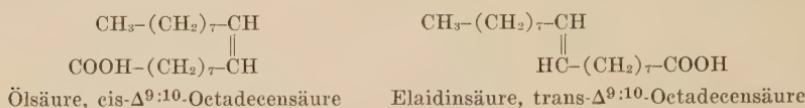
Reaktionsgemisch:	Fermentlösung	2.0 cem
	<i>M</i> /10000 Mb.	0.5 cem
	<i>M</i> /50 Donator	1.5 cem

Konzentration	Entfärbungszeit			
	Ölsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure	Gemisch
<i>M</i> /40	1.5 cem	1.5 cem	1.5 cem	je 0.5 cem
	10'30"	9'20"	6'15"	7'03"
<i>M</i> /60	11'05"	10'15"	7'35"	8'05"
<i>M</i> /80	12'50"	12'15"	10'50"	11'25"
<i>M</i> /100	17'25"	15'50"	14'55"	15'07"

XI. DIE STEREOISOMERISCHEN BEZIEHUNGEN DES DONATORS
ZUR FETTSÄUREDEHYDROGENASE.

Die Oxydierbarkeit des stereoisomerischen Substanzen studierten T. Thunberg, F. Battelli und L. Stern (1911), neuerdings I. Yamamoto (1934) und I. Zaitsu (1936) eingehend.

Verf. untersuchte die Oxydierbarkeit der Ölsäure und deren Stereoisomerie, der Elaidinsäure. Elaidinsäure wird nach der Methode von Farnsteiner (1923) dargestellt. Nach A. Müller und G. Shearer (1923) sind die Formula der beiden Säuren folgende:



Aus Tabelle XIX ist zu ersehen, dass die Ölsäure im Vergleich zu der Elaidinsäure schneller oxydiert wird. Es ist interessant, dass die Elaidinsäure in keinem natürlichen Fett angetroffen wird, während die Ölsäure der Hauptbestandteil des natürlichen Fettes ist. (H. Schönfeld. 1936).

TABELLE XIX.
Die stereoisomerische Beziehung des Donators zur
Fettsäuredehydrogenase.

Endkonz. des Donators	Entfärbungszeit	
	Ölsäure	Elaidinsäure
M/300	7'25"	16'40"
M/200	6'15"	12'15"
M/100	6'05"	13'05"

XII. DIE BEDEUTUNG DER FETTSÄUREDEHYDROGENASE FÜR DEN FETTSTOFFWECHSEL.

Aus oben beschriebenen Tatsachen ist klar, dass die Fettsäuredehydrogenase auf die Fettsäuren wirkt und zwei H-Atome davon losgelöst werden, und dann die ungesättigten Fettsäuren mit einer Doppelbindung entstehen. Aber es ist noch unklar, in welcher Stellung diese Doppelbindung entsteht. Dakin und Wieland vermuteten diese Doppelbindung zwischen α - und β -Carbonatom; J. H. Quastel (1926), der eine Hypothese vom Standpunkt der Elektronentheorie von J. J. Thomson aufstellte, um den Mechanismus der Dehydrogenation zu erklären, behauptete, dass bei der

Fettsäureoxydation das Ferment das Fettsäuremolekül aktiviert und $\alpha\beta$ -ungesättigte Verbindung entstehen muss. Aber die entscheidende Tatsache ist noch nicht gefunden. R. Kuhn und K. Livada (1933) stellte fest, dass α -ständige Äthyl- oder Äthylidengruppen sowie β -ständige Methylgruppe den Abbau von Phenylfettsäuren vollständig verhindern, welche in nicht alkylierter Form leicht β -oxydiert werden. Mazza und seiner Mitarbeiter hatte die Ölsäure mit Doppelbindung zwischen α - und β -Stellung dargestellt, ihre Oxydierbarkeit mit Ferment untersucht und bestätigt, dass enzymatische Dehydrogenation bei Abwesenheit von $\alpha\beta$ -Doppelbindung durchgeführt wird.

Daher glaubte Verf., dass die enzymatische Dehydrogenation der Fettsäure zuerst in $\alpha\beta$ -Stellung dieser Moleküle geschieht. Das Fettgewebe enthält Lipase, und dadurch wird das Depotfett gespalten oder synthetisiert. Aber die frei gemachte Fettsäure ist undiffusibel und schwer transportierbar, deshalb wird sie infolge von Umesterung als Phosphatid oder Cholesterolester transportiert. Aber bei Hunger und Verfütterung von Fett nimmt das Blut nicht nur Phosphatid oder Cholesterolester, sondern auch Fettsäure auf, und daher muss die Fettsäure unverändert transportiert werden. Die ungesättigte Fettsäure ist gegenüber gesättigter diffusibel und reaktionsfähiger. So wird durch Desaturation mittels der Fettsäuredehydrogenase die Fettsäure diffusibel und transportfähig und wandert vom Depotfett aus. Verfütterung von reichlich körperfremden Fetten verursacht die direkte Ablagerung im Depot, aber normalerweise hat das Depotfett körpereigene Zusammensetzung, unabhängig von der Nahrung. Diese Tatsache zeigt, dass die Fettsäure trotz verschiedenem Ausgangsmaterial in gleicher Zusammensetzung, nämlich in gleichem Entstättigungsgrade erhalten wird. Dieser Mechanismus geht auch bei Fettsäuredehydrogenase vor sich.

XIII. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Dehydrogenase von höheren Fettsäuren befindet sich im Fettgewebe am stärksten, in Leber und Pankreas schwächer, in anderen Organen nicht. Im Pflanzenreich wird sie auch gefunden.

2. Die Fettsäuredehydrogenase wird mit Phosphat gut extrahiert, besonders mit $M/15$ — $M/45$ Phosphat. Unter einigen Fettgeweben enthält sie das Unterhautfettgewebe am reichlichsten.
3. Die Fettsäuredehydrogenase zeigt Eiweissreaktion und nicht Zucker- oder Lipoidreaktion. Ihr Fett- und Eiweissgehalt wird bestimmt.
4. In der Fettsäurekonzentration von $M/100$ geht diese Dehydrogenation im Optimum vor sich.
5. Die optimale H-Ionenkonzentration liegt von pH 7.5 bis 8.0, die optimale Temperatur von 35° bis 40°C .
6. Diese Dehydrogenase wird, ebenso wie Lipase, durch Phosphat, Ca, Gallensäure und Albumin aktiviert und durch Ba, Mg, Al, Trypsin und Schwermetalle, besonders durch Ag, Hg und Cu stark inaktiviert.
7. In Gegenwart von Methylenblau zeigt die Fettsäuredehydrogenase ein deutliches Reduktionspotential.
8. Durch Einwirkung dieser Dehydrogenase auf die gesättigte Fettsäure, deren C-Atomzahl über 10 ist, besteht eine Doppelbindung, aber sie ist unwirksam gegen die Fettsäure, deren C-Atomzahl unter 8 ist.
9. Unter den ungesättigten Fettsäuren wird nur Ölsäure oxydiert und die Linolsäure und Linolensäure nicht. Die Fettsäurederivate, die keine Karboxylgruppe haben, und Cholesterin und Lezithin werden nicht oxydiert.
10. Zwischen Lipase und Fettsäuredehydrogenase wird keine Beziehung gefunden, aber Katalase und Dehydrogenase sind im Unterhautfettgewebe am stärksten.
11. Die Einzigkeit der Fettsäuredehydrogenase wird bestimmt.
12. Die Elaidinsäure wird durch dieses Ferment im Vergleich zur Ölsäure, deren Stereoisomerie sie ist, schwer angegriffen.
13. Die Bedeutung dieser Dehydrogenase für den Fettstoffwechsel wird diskutiert.

B. Über die Oxydation der niederen Fettsäuren und ihren Phenyllderivaten.

Neuerdings hat I. Yamamoto (1934) in diesem Laboratorium gefunden, dass Lacto-Dehydrogenase in Anwesenheit von Coferment Milchsäure zu Brenztraubensäure leicht dehydrogeniert aber nicht dessen Phenylderivate. Weil die wichtige Theorie der Fettsäure-Oxydation auf experimentelle Befunde über Phenyl-derivate gebaut wurde, hat der Verfasser nochmal diese Untersuchung durchgeführt um zu studieren wie verschieden die Oxydierbarkeit der Fettsäure und deren Phenylderivate sei. Über die Oxydation von niederen Fettsäuren wurden bereits manche Arbeiten durchgeführt. Neuerdings studierten B. Kisch (1932), J. H. Quastel und A. H. M. Wheatley (1933), M. Jowet und J. H. Quastel (1935) und E. Ciaranfi (1936) die Fettsäureoxydation nach der neuen Warburgschen Methode. Verf. untersuchte die Oxydation der Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Kroton-, Valeriansäure und ihren Phenyllderivaten mittels der Warburgschen Methode.

I. VERSUCHSMETHODIK.

Verf. brauchte die manometrische Methode von Warburg. Die Atmungsgefäße enthalten eine bestimmte Menge von Medium, im Anhang 0.2 ccm von 6%iger KOH-Lösung zur Absorption von Kohlensäure und je einige Schnitte der Leber eines Meerschweinchens, das durch Durchschneiden der Carotis verblutet war. Die Schichtdicke der Schnitte ist 0.4–0.5 mm. Der Sauerstoffverbrauch wird nach Erreichen des Temperaturgleichgewichtes während 90 bis 120 Minuten alle 10 Minuten gemessen. Am Ende dieser Zeit werden die Schnitte aus dem Gefäße genommen, bei 100°C getrocknet und gewogen. Das Trockengewicht der Schnitte beträgt 5–10 mg. Die Luft im Gefäß und Manometer wird mit Sauerstoff gewechselt, die Temperatur ist 37°C. Als Medium wird NaCl + Phosphat gebraucht, die Fettsäure als 0.064 Mol. Lösung von Natriumsalz angewandt.

II. DARSTELLUNG DER PHENYLFETTSÄUREN.

a) β -Phenylpropionsäure $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$.

Wird nach der F. W. Henleschen Methode (1921) durch Einwirkung von Natriumamalgam auf Zimtsäure dargestellt. Sie hat die Form langer Nadeln vom Schmelzpunkt $47^{\circ}C$.

b) γ -Phenylbuttersäure $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$.

Zuerst wird die β -Benzoylpropionsäure nach W. H. Carothers (1933) und C. R. Noller (1935) aus Bernsteinsäureanhydrid, Benzol und Aluminiumchloridanhydrid dargestellt. Dann wird die β -Benzoylpropionsäure mit Zn-Amalgam und HCl zu γ -Phenylbuttersäure reduziert, welche mit Äther extrahiert und gereinigt wird. Sie krystallisiert in langen flachen Blättchen und schmilzt bei $46^{\circ}C$.

c) Phenylkrotonsäure $C_6H_5 \cdot CH : CH \cdot CH_2 \cdot COOH$.

Diese Säure wird nach H. W. Jayne (1882) dargestellt. Sie hat die Form langer, dünner Nadeln vom Schmelzpunkt $86^{\circ}C$.

d) δ -Phenylvaleriansäure $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$.

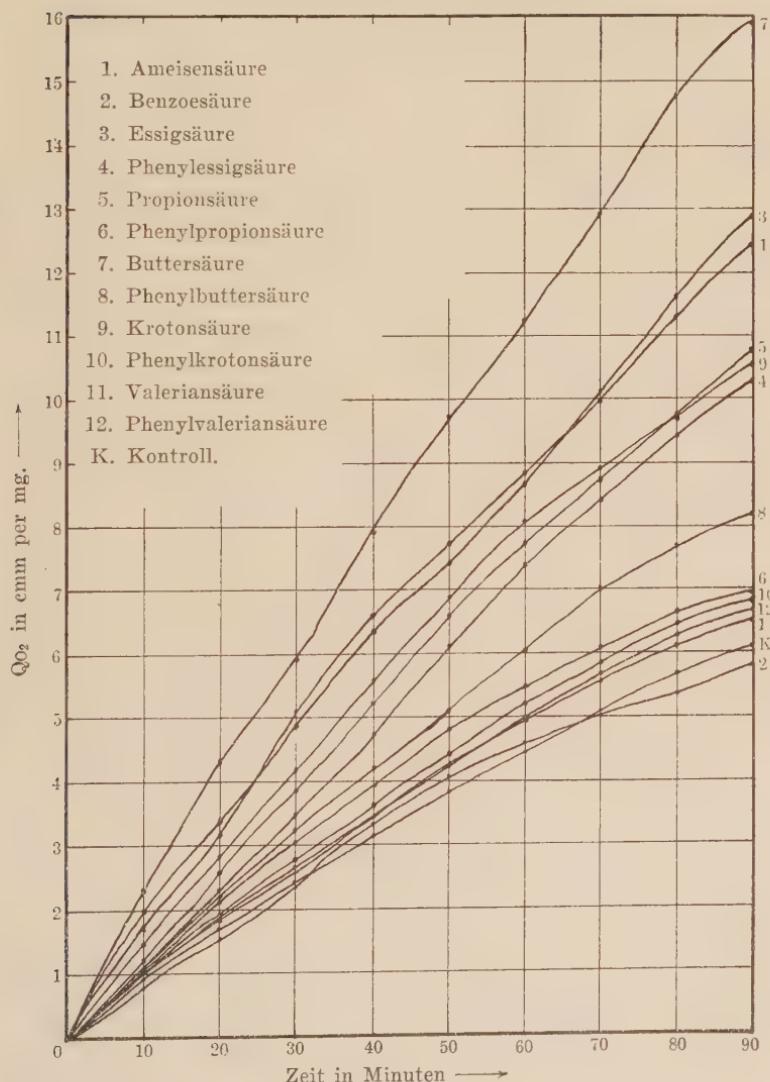
Die Cinnamylacrylsäure ($C_6H_5 \cdot CH : CH \cdot CH : CH \cdot COOH$), die nach R. Fittig und E. Mayer (1892) dargestellt ist, wird nach A. Baeyer und O. R. Jackson (1880) mit Na-Amalgam behandelt, so bekommt man die Hydrocinnamylacrylsäure ($C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH : CH \cdot CH_2 \cdot COOH$). Diese Säure wird mit NaOH zu Phenyl- $\alpha\beta$ -Pentensäure reduziert und dann mit Na-Amalgam behandelt, darauf tritt die Phenylvaleriansäure in Erscheinung. (R. Fittig und T. Hoffmann. 1894). Diese Säure besteht aus feinen prismatischen Blättchen vom Schmelzpunkt $57^{\circ}C$.

III. EXPERIMENTELLES.

Zuerst untersuchte Verf. den Sauerstoffverbrauch der Meerschweinchenleber ohne Zusatz von Fettsäure. Bei Ringer und $NaCl + Phosphat$ ist der O_2 -Verbrauch fast gleich, aber durch Zusatz von Fettsäure nimmt derselbe bei Phosphat beträchtlich, bei Ringer dagegen nur gering zu. Bei Glycerophosphat ist der O_2 -Verbrauch ohne Zusatz von Fettsäure sehr stark und wird durch deren Zusatz

noch stärker. Daher kann man sagen, dass Phosphat und auch das Glycerophosphat aktivierend auf die Fettsäureoxydation wirkt,

Fig. I.
Der Sauerstoffverbrauch der Meerschweinchenleber bei Gegenwart
von Fettsäuren und ihren Phenylderivaten.

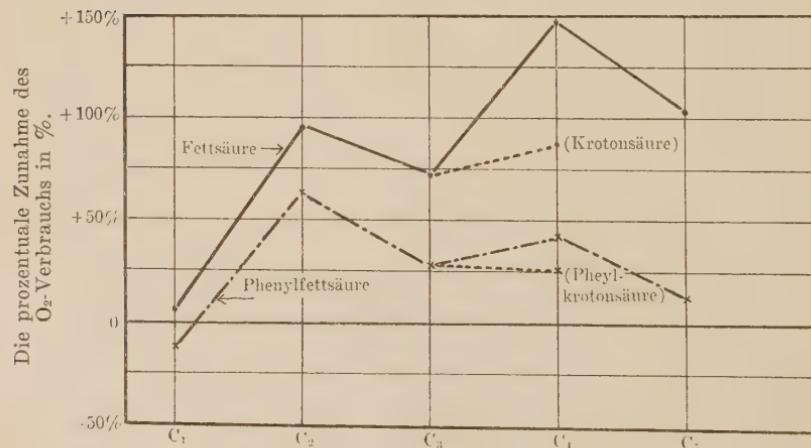


aber das Letztgenannte selbst durch Leber oxydiert wird. Verf. brauchte in allen unten erwähnten Versuchen $\text{NaCl} + \text{Phosphat}$ als Medium.

Bei Ameisen- und Benzoesäure ist der O_2 -Verbrauch fast gleich wie bei der Kontrolle. Daher wird die Ameisen- und Benzoesäure durch Leber nicht oxydiert. Essig- und Phenylessigsäure, Propion- und Phenylpropionsäure, Butter- und Phenylbuttersäure, Kroton- und Phenylkrotonsäure, Valerian- und Phenylvaleriansäure werden alle durch Leber oxydiert. (Fig. I).

Fig. II zeigt die prozentuale Zunahme des O_2 -Verbrauchs von niederen Fettsäuren und ihren Phenylfettsäuren. Alle untersuchten Fettsäuren, ausschliesslich der Ameisen- und Benzoesäure, steigerten den O_2 -Verbrauch aber die Zunahme des O_2 -Verbrauchs ist viel stärker bei der Fettsäure von geradzahliger C-Atomzahl als bei der nächsten ungeradzahligen Fettsäure. Es ist auch auffallend dass die Einführung der Phenylgruppe eine Herabsetzung der Oxydierbarkeit herbeiführt. Anderseits prüfte Verf. die Oxydation von oben beschriebenen Fettsäuren und ihren Phenyl-derivaten mit Leberbrei, aber die Oxydation ist viel schwächer im Vergleich zu der der Schnitte.

Fig. II.
Die prozentuale Zunahme des O_2 -Verbrauchs bei Gegenwart von Fett- und Phenylfettsäuren.



IV. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Darstellungsmethode der Phenylfettsäuren wird beschrieben.

2. Die Phosphationen sind bei der Oxydation der niederen und auch der höheren Fettsäuren unentbehrlich.

3. Unter den niederen Fettsäuren und ihren Phenylfettderivaten wird nur die Ameisen- und Benzoesäure durch Leber nicht oxydiert.

4. Essig-, Propion-, Butter-, Kroton-, Valeriansäure und ihre Phenyldeivate werden gut oxydiert durch Leberschnitt. Aber die Oxydierbarkeit der Phenyldeivate wird stark herabgesetzt.

5. Der O_2 -Verbrauch der Fettsäuren, deren C-Atome geradzahlig sind, ist viel stärker als der, der nächsten ungeradzahligen Fettsäuren.

6. Der Leberbrei oxydiert auch die obengenannten Fettsäuren und ihre Phenyldeivate, aber die Oxydation ist viel schwächer als durch Leberschnitte.

Am Schlusse dieser Ausführungen ist es mir ein aufrichtiges Bedürfnis Herrn Professor Dr. K. Kodama für freundliche Anregung und Leitung bei meinen Untersuchungen meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Bach, A. (1905): Ber. chem. Ges., **38**, 1878.
 Baeyer, A. und Jackson, O. R. (1880): Ber. chem. Ges., **13**, 115.
 Bang, I. (1920): Mikromethoden z. Blutuntersuchung., 13.
 Battelli, F. und Stern, L. (1911): Biochem. Zs., **31**, 478.
 Bloor, W. R. (1914): Jl. Biol. Chem., **17**, 377.
 Berend, N. (1933): Biochem. Zs., **260**, 490.
 Carothers, W. H. (1933): Organic syntheses, **13**, 12.
 Ciaranfi, E. (1936): Biochem. Zs., **285**, 228.
 Cimmino, A. und Mazza, F. P. (1933): Boll. Soc. ital. Biol., sper., **8**, 531.
 Dakin, H. D. (1908, 1909): Jl. Biol. Chem., **4**, 79, 91, 277, 419; **5**, 173, 303; **6**, 203, 221.
 Dakin, H. D. (1922): Oxidations and reductions in the animal body., 26.
 Duffy, P. (1853): Liebig's Ann., **88**, 287.

Eckstein, H. C. (1929): *Jl. Biol. Chem.*, **81**, 613; **84**, 353.

Embden, G. und Kalberlah, F. (1906): *Hofmeister's Beitr.*, **8**, 121.

Embden, G., Salomon, H. und Schmidt, Fr. (1906): *Ebenda*, **8**, 129.

Euler, H. (1906): *Ebenda*, **7**, 1.

Farnsteiner (1923): Vanino; *Präparative Chemie.*, 120.

Fittig, R. und Mayer, E. (1892): *Liebig's Ann.*, **286**, 50.

Fittig, R. und Hoffmann, T. (1894): *Liebig's Ann.*, **283**, 308.

Grande, F. (1934): *Skandin. Arch. f. Physiol.*, **69**, 189.

Henle, F. W. (1921): *Anleitung org.-chem. Prak.*, 160.

Hess, K. und Messmer, E. (1921): *Ber. chem. Ges.*, **54**, 499.

Jayne, H. W. (1882): *Liebig's Ann.*, **216**, 97.

Jowet, M. und Quastel, J. H. (1935): *Biochem. Jl.*, **29**, 2143, 2159.

Kaufmann, H. P. (1926): *Z. f. Untersuchung d. Nahrungs- und Genussmittel.*, **1**, 3 u. 15.

Kisch, B. (1932): *Biochem. Zs.*, **253**, 347.

Knoop, F. (1905): *Hofmeister's Beitr.*, **6**, 150.

Kodama, K. (1926): *Biochem. Jl.*, **20**, 1095.

Kuhn, R. und Livada, K. (1933): *Z. Physiol. Chem.*, **220**, 235.

Mazza, F. P. (1934): *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, **9**, 298.

Müller, A. und Shearer, G. (1923): *Jl. chem. Soc. London.*, 123.

Noller, C. R. (1935): *Organic syntheses*, **15**, 64, 92.

Powell, M. (1930, 1932): *Jl. Biol. Chem.*, **89**, 547; **95**, 143.

Quagliariello, G. (1932): *Atti Accad. naz. Lincei.*, **6**, 16, 552.

Quastel, J. H. (1926): *Biochem. Jl.*, **20**, 166.

Quastel, J. H. und Wheatley, A. H. M. (1933): *Biochem. Jl.*, **27**, 1753.

Rosling, E. (1924): *Skandin. Arch. f. Physiol.*, **45**, 132.

Schönfeld, H. (1936): *Chem. und Technol. d. Fette und Fettprodukte.*, 31.

Scorz, G. und Quagliariello, G. (1932): *Arch. di Sci. biol.*, **17**, 530.

Stolfi, G. und Mazza, F. P. (1933): *Atti Accad. naz. Lincei.*, **6**, 17, 476.

Stolfi, G. und Mazza, F. P. (1933): *Boll. Soc. ital. Biol.*, **8**, 1780.

Tangl, H. und Berend, N. (1930, 1931): *Biochem. Zs.*, **220**, 234; **232**, 181.

Thunberg, T. (1920): *Skandin. Arch. f. Physiol.*, **40**, 1.

Thunberg, T. (1921): *Arch. Internat. Physiol.*, **18**, 601.

Toyama, J. (1933): *Fukuoka-Ikwadaigaku-Zasshi*, **26**, 1483.

Toyama, J. (1933): *Jl. Biochem.*, **17**, 433.

Tsukano, M. (1932): *Ebenda*, **15**, 487.

Wieland, H. (1922): *Ergebnisse d. Physiol.*, **20**, Jahrg. 447.

Willstätter, R. und Waldschmidt-Leitz, E. (1923): *Z. Physiol. Chem.*, **125**, 93, 132.

Yamamoto, I. (1934): *Fukuoka-Ikwadaigaku-Zasshi*, **27**, 2466.

Zaitsu, I. (1936): *Ebenda*, **29**, 1714.

Zummo, C. und Mazza, F. P. (1933): *Atti Accad. naz. Lincei.*, **6**, 18, 461.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER PENTOSURIE BEI EXPERIMENTELLEM STAUUNGSIKTERUS.

VON

TOKUHARU ISHIHARA.

(*Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama.*

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 9. Juli 1937)

Durch Untersuchungen vieler Autoren (Karasawa, Hatakeyama, Okamura, Yata, Tanaka, 1926/27/28/30) ist bekannt geworden, dass der Nucleinstoffwechsel durch Gallensäure stark gefördert wird, was eine vermehrte Ausscheidung der Stoffwechselprodukte des Nucleins im Harn zur Folge hat. Bei experimentellem Stauungskterus und bei Zufuhr von Gallensäure hat Kobayashi (1928) im Harn des Kaninchens ein Kohlehydrat gefunden, welches er als *dl*-Arabinose erklärte und das als ein abnormes Stoffwechselprodukt eines Nucleinsäurebestandteils im Zellkern betrachtet wurde.

Was die Kohlehydratkomponente der Nucleinsäure anbetrifft, so ist bekannt, dass die Pentose aus Hefenucleinsäure und aus den freien Mononucleotiden der tierischen Gewebe *d*-Ribose ist (Levene u. Jacob, 1908/09/10/11), dass dagegen die aus Thymusnucleinsäure *d*-2-Ribodesose oder Thyminose ist (Levene, London, Mori, 1929).

Obwohl die Harnpentose zuerst von Neuberg (1900, 1913) und Aron (1913) hauptsächlich als *dl*-Arabinose erkannt wurde, wurde doch *l*-Ketoxylose in der überwiegenden Mehrzahl der Pentosuriker im Harn gefunden (Zenner, Waltuch, Hiller, Levene, Peter Búlint, 1913/14/17/34).

Um einerseits die Natur von Harnpentose beim Stauungskterus und bei Zufuhr von Gallensäure sicher festzulegen und um andererseits den Einfluss der Gallensäure auf den Nucleinstoffwechsel genau zu erkennen, habe ich dieses Thema noch einmal aufgenommen. Zuerst wurde die tägliche Ausscheidung der

Pentose im Harn mittelst der von Tollens modifizierten Furfurolsalzsäuredestillationsmethode verfolgt; dabei wurde gefunden, dass bei experimentellem Stauungskiterus die Menge der Pentose im Harn sich stark vermehrt, und 2-3 Tage nach der Operation mit der ikterischen Verfärbung den höchsten Punkt erreicht, um sich dann direkt vor dem Tode plötzlich stark zu vermindern (Tabelle I u. II).

Durch tägliche Zufuhr von Gallensäure wurde die Harnpentose überall gesteigert (Tabelle III), obwohl diese Steigerung nicht den gleichen Wert wie bei experimentellem Stauungskiterus erreichte.

Aus 30 Liter Harn von stauungskiterischen Kaninchen wurde nach der Vorschrift von Neuberg (1900) eine kristallinische, optisch inaktive *dl*-Arabinose von der Formel $C_5H_{10}O_5$ erhalten. Schmelzpunkt: 162-163°. Sie wurde weiter durch Herstellung von *p*-Bromphenylhydrazon, Benzylphenylhydrazon, Methylphenylhydrazon als *dl*-Arabinose identifiziert.

Die *dl*-Arabinoseausscheidung im Harn bei experimentellem Stauungskiterus kommt also durch die den Nucleinstoffwechsel fördernde Wirkung der Gallensäure zustande und diese Pentose dürfte wohl von der Nucleinsäurekomponente unter Umwandlung der Thyminose oder der *d*-Ribose herstammen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

A. Bestimmung der Harnpentose.

Zum Versuche wurden gut ausgewachsene männliche Kaninchen gewählt, die unter möglichst gleichen Bedingungen mit bestimmter Nahrung (Okara aus Sojabohnen) 1-2 Wochen lang gefüttert und vor jedem Versuche einen ganzen Tag im Hunger gehalten worden waren.

Diese Tiere wurden in drei Gruppen geteilt; die eine Gruppe bekam als Kontrolle nur einen Laparotomie-Eingriff; bei der zweiten wurde unter Laparotomie der Ductus Choledochus fest unterbunden; der dritten wurden nach der Laparotomie täglich um 8 Uhr morgens 3 ccm einer 1%igen Na-Cholatlösung pro Kilo Körpergewicht subcutan verabreicht.

Der tägliche Harn wurde bei diesen drei Gruppen unter Toluol angesammelt und durch Katheterisierung des übrigen Harns um 8 Uhr morgens abgegrenzt. Jedesmal nach der Katheterisierung des Harns wurden den Kaninchen 100 ccm Wasser per os verabreicht.

Die Harnpentose wurde mittelst der von Tollens modifizierten Furfurolsalzsäuredestillationsmethode bestimmt.

Aus Tabelle I lässt sich ersehen, dass sich das Körpergewicht sowie die Harnmenge im Laufe des Hungertages allmählich verminderte, und dass der Harn sauer oder neutral reagierte.

Die Harnpentose wurde dabei ohne merklich tägliche Schwankung in minimaler Menge nachgewiesen und zwar betrug sie 0,3554–0,8189 mg, durchschnittlich 0,5525 mg.

TABELLE I.
(Kontrolle)

Nr.	Dat. 1935	Körper- gewicht g	Harn		Phloro- glucid mg	Furfurol mg	Pentose mg
			Menge ccm	Reak- tion			
I	10/8	2400	80	sauer	0,4	0,2095	0,4121
	11/„	2315	78	„	0,7	0,3646	0,7172
	12/„	2253	75	„	0,6	0,3129	0,6155
	13/„	2180	78	„	0,4	0,2095	0,4121
	14/„	2105	54	neutral	0,3	0,1578	0,3554
	15/„	2050	60	sauer	0,5	0,2612	0,5138
II	18/8	2505	81	„	0,6	0,3129	0,6155
	19/„	2420	65	„	0,4	0,2095	0,4121
	20/8	2370	69	„	0,7	0,3646	0,7172
	21/„	2310	79	neutral	0,3	0,1578	0,3554
	22/„	2260	80	sauer	0,6	0,3129	0,6155
	23/„	2205	61	„	0,4	0,2095	0,4121
III	13/9	2280	99	„	0,7	0,3646	0,7172
	14/„	2200	45	„	0,5	0,2612	0,5138
	15/„	2120	50	neutral	0,8	0,4163	0,8189
	16/„	2065	60	„	0,4	0,2095	0,4121
	17/„	2010	48	sauer	0,6	0,3129	0,6155
	18/„	1960	45	„	0,7	0,3646	0,7172

Beim experimentellen Stauungskiterus (Tabelle II) nahmen

Körpergewicht und Harnmenge allmählich ab und die ikterische Conjunktivalverfärbung trat erst 24 Stunden nach der Operation auf. Die Tiere konnten dabei 4–6 Tage lang leben. Die Harnreaktion verschob sich dabei zur alkalischen Seite hin, was Ohashi bereits (1935) beobachtete.

Die Harnpentose vermehrte sich parallel mit der ikterischen Verfärbung, um vor dem Tode plötzlich abzunehmen, und zwar betrug sie 2,3444–4,3784 mg, durchschnittlich 3,3317 mg. Die prämortale Verminderung der Harnpentose scheint wohl auf Cholaemie zu beruhen.

TABELLE II.
(Stauungskterus des Kaninchens)

Nr.	Dat. 1935	Körper- gewicht g	Harn		Phloro- glucid mg	Furfurol mg	Pentose mg
			Menge ccm	Reak- tion			
I	20/8	2730	79	alkalisch	2,9	1,5020	2,9546
	21/„	2650	72	„	3,5	1,8122	3,5648
	22/„	2525	64	„	4,0	2,0707	4,0733
	23/„	2400	44	„	2,6	1,3469	2,6495
II	25/8	2115	60	alkalisch	2,9	1,5020	2,9546
	26/„	2010	50	„	3,3	1,7088	3,3614
	27/„	1950	67	„	4,2	2,1741	4,2767
	28/„	1880	40	neutral	3,7	1,9156	3,7682
	29/„	1810	38	alkalisch	2,7	1,3986	2,7512
III	7/9	2300	60	alkalisch	3,4	1,7605	3,4630
	8/„	2180	67	„	3,1	1,6054	3,1580
	9/„	2110	62	„	3,9	2,0190	3,9716
	10/„	2050	42	„	3,5	1,8122	3,5648
	11/„	1960	36	„	2,3	1,1918	2,3444
IV	13/9	2250	43	alkalisch	2,8	1,4503	2,8529
	14/„	2170	65	„	3,0	1,5537	3,0563
	15/„	2100	68	„	3,2	1,6571	3,2597
	16/„	2010	59	„	3,8	1,9673	3,8699
	17/„	1960	45	„	3,3	1,7088	3,3614
	18/„	1900	35	„	2,5	1,2952	2,5478
V	22/9	2640	74	alkalisch	3,2	1,6571	3,2597
	23/„	2580	60	„	3,6	1,8639	3,6665
	24/„	2470	55	„	4,3	2,2258	4,3784
	25/„	2410	64	„	2,8	1,4503	2,8529

Aus Tabelle III ist ersichtlich, dass die Harnpentose durch Zufuhr der Gallensäure im allgemeinen vermehrt wurde, und zwar

dass sie 1,9376–3,0563 mg, durchschnittlich 2,5195 mg betrug. Das Körpergewicht und die Harnmenge verminderten sich dabei allmählich und der Harn reagierte immer alkalisch, wie schon Ohashi (1935) angezeigt hat.

TABELLE III.
(1% Na-Cholatlösung pro Kilo 3 ccm subcutan injiziert)

Nr.	Dat. 1935	Körper- gewicht g	Harn		Phloro- glucid mg	Furfurol mg	Pentose mg
			Menge cem	Reak- tion			
I	23/9	2550	77	alkalisch	2,2	1,1401	2,2427
	24/„	2430	75	„	2,5	1,2952	2,5478
	25/„	2360	69	„	2,6	1,3469	2,6495
	26/„	2300	66	„	2,4	1,2435	2,4461
	27/„	2245	60	„	3,0	1,5537	3,0563
	28/„	2190	54	„	2,6	1,3469	2,6495
II	2/10	2410	78	alkalisch	2,1	1,0884	2,1410
	3/„	2290	75	„	2,7	1,3986	2,7512
	4/„	2182	78	„	2,9	1,5020	2,9546
	5/„	2050	60	„	2,5	1,2952	2,5478
	6/„	1930	54	„	2,0	1,0367	2,0393
	7/„	1870	48	„	2,8	1,4503	2,8529
	9/„	2350	73	alkalisch	1,9	0,9850	1,9376
III	10/„	2280	63	„	2,0	1,0367	2,0393
	11/„	2160	52	„	2,5	1,2952	2,5478
	12/„	2130	45	„	2,3	1,1918	2,3439
	13/„	2080	46	„	2,8	1,4503	2,8529
	14/„	2040	45	„	2,7	1,3986	2,7512

B. Isolierung der *dl*-Arabinose.

30 Liter stauungskterischen Kaninchenharns wurden zuerst nach der Vorschrift von Kobayashi verarbeitet. Das dabei erhaltene Diphenylhydrazone der Harnpentose schmilzt bei 206–207° und ist in einer Pyridinlösung optisch inaktiv. Ausbeute 1,7 g.

3,005 mg Subst.: 0,2376 cem N (22°, 760,6 mm Hg)

$C_{17}H_{20}O_4N_2$ Ber. N 8,87

Gef. „ 8,92

Die Eigenschaften des Diphenylhydrazons stimmten mit den Angaben von Neuberg sowie von Kobayashi gut überein.

Die freie Pentose wurde genau nach der Methode von Neuberg durch Zerlegung mit frisch destilliertem Formalin erhalten. Die von Formaldehyddiphenylhydrazone befreite Flüssigkeit wurde im Vakuum bis zu einem fast farblosen Syrup eingeengt und gut getrocknet, wobei nach mehrfachem Umrühren ein hart erstarrter Kristallkuchen erhalten wurde. Der Kuchen wurde zuerst mit ein wenig Methanol digeriert und dann aus Wasser mehrmals umkristallisiert: Glänzende prismatische Nadeln, Plättchen oder zu harten Drusen vereinigte Kristallaggregate von rein süßem Geschmack. Schmelzpunkt 162–163°. Ausbeute 0,4 g. Seine Lösung ist optisch inaktiv.

4,661, 4,706, 4,747 mg Subst.:

6,805, 6,980, 6,955 mg	CO ₂	2,750, 2,820, 2,860 mg	H ₂ O
C ₅ H ₁₀ O ₅	Ber.	C 40,00	H 6,67
	Gef.	„ 39,84	„ 6,60
		„ 40,17	„ 6,71
		„ 39,97	„ 6,74

Eine minimale Menge des Kristalls ergab die Tollensche Phloroglucin- u. Orcinreaktion und reduzierte intensiv die Fehlingsche Lösung.

Benzylphenylhydrazone.

Eine Lösung von 0,1 g der Harnpentose in ein wenig Wasser wurde mit 0,15 g Benzylphenylhydrazin in 5 ccm absolutem Alkohol etwa 10 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt. Der dabei abgeschiedene Kristallbrei wurde aus Piridin-Alkohol umkristallisiert. Das reine Hydrazon schmilzt bei 183°–184° und erweist sich optisch ganz inaktiv.

2,409 mg Subst.: 0,17393 ccm N (16°, 771 mm Hg)

C ₁₈ H ₂₂ O ₄ N ₂	Ber.	N 8,48
	Gef.	„ 8,50

Methylphenylhydrazone.

Dieses Hydrazon der Harnpentose wurde mit Methylphenyl-

hydrazin in genau gleicher Weise wie beim Benzylphenylhydrazon bereitet; es wurde aus Alkohol umkristallisiert: Glänzende Nadeln oder sechseckige Plättchen vom Schmelzpt. 173–174°.

Auch seine Lösung ist optisch inaktiv.

2,680 mg Subst.: 0,2499 cem N (15,5° 770 mm Hg)

$C_{12}H_{18}O_4N_2$ Ber. N 11,02
Gef. .. 10,99

P-Bromphenylhydrazon.

0,1 g der Pentose wurde in einer möglichst kleinen Menge Wasser gelöst, mit einer alkoholischen Lösung von 0,15 g P-Bromphenylhydrazin 30 Minuten lang gekocht und weitere 12 Stunden in der Kälte aufbewahrt. Das dabei ausgeschiedene Kristallisat wurde aus heißem Wasser umkristallisiert. Feine Nadeln von Schmelzpunkt 161–162°.

2,610 mg Subst.: 0,19672 cem N (16° 769 mm Hg)

$C_{11}H_{16}BrN_2O_4$ Ber. N 8,78
Gef. .. 8,84

LITERATUR.

Aron, H. (1913): Z. f. Kinderheilk., 1913, 77.
 Hatakeyama, T. (1927): The Journ. of Bioch., 8, 261.
 Hiller, A. (1917): J. of Biol. Chem., 30, 129.
 Karasawa, R. (1926): The Journ. of Bioch., 6, 139.
 „ (1927): Ebenda 7, 145.
 Kobayashi, T. (1928): Ebenda 9, 251.
 Levene, P. A. u. Jacob, W. A. (1908/09/10/11): Ber. Chem. Ges., 42, 748; 42, 335, 2474, 2703; 43, 3150, 3162; 44, 746.
 Levene, P. A. u. La Forge (1913/14): J. of Biol. Chem., 15, 481, 18, 319.
 Levene, P. A. u. London, E. S. (1929): J. of Biol. Chem., 81, 711.
 Levene, P. A. u. Mori, T. (1929): Ebenda 83, 803.
 Neuberg, C. (1900): B., 33, 2243.
 Neuberg, C. (1913): Biochem. Z., 56, 506.
 Okamura, Takeji (1928): The Journ. of Bioch., 8, 391.
 Okamura, Teiji (1923): Ebenda, 9, 271.
 Ohashi, K. (1935): Arb. Med. Fakult. Okayama, 4, 583.
 Peter Búlint (1934): Bioch. Z., 274, 3054.
 Yata, S. u. Tanaka, K. (1930): Arb. Med. Fakult. Okayama, 2, 304.
 Zerner, E. u. Waltuch, R. (1914): Bioch. Z., 58, 410.

ÜBER DAS VERHALTEN DES KUPFERS UND EISENS BEI DER BEBRÜTUNG DER HÜHNEREIER.

VON

MITZIMASA IMAIZUMI.

(*Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät
Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.*)

(Eingegangen am 12. Juli 1937)

Vom Standpunkt der Embryochemie habe ich in der vorliegenden Arbeit das Verhalten des Kupfers und Eisens in Eigelb, Eierklar, Embryo, Allantois- sowie in Amnionwasser bei der Bebrütung der Hühnereier studiert. In jüngster Zeit (1929, 1929) wird das Kupfer als neues hämoglobinsteigerndes Element von vielen Seiten in Betracht gezogen. A Loeschke (1931) hat festgestellt, dass sich die Leber in den entwickelten Kücken 1-2 Tage vor dem Ausschlüpfen gegenüber dem Gesamtorganismus in erheblichem Masse mit Kupfer anreichert. Bei der Bebrütung der Hühnereier haben W. D. McFarlane (1934) und H. I. Milne die Zunahme des Kupfers sowie des Eisens im Lebergewebe beobachtet.

Meine Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Wie die Tabelle zeigt, sieht man, dass die Gesamtmenge des Eisens in Eigelb und in Eierklar bei der Bebrütung abnahm und anderseits eine deutliche Anreicherung des Eisens im Embryo erschien. Diese Umwandlung trat auffallend nach 18 Tagen der Bebrütung auf. Nach zwei Wochen der Bebrütung wurde eine deutliche Zunahme des Kupfers im Embryo und eine Abnahme desselben in Eigelb und Eierklar beobachtet. Eine Spur Eisen wurde auch in Allantois- aber nur wenig in Amnionwasser nachgewiesen. Kupfer wurde nicht in diesen Flüssigkeiten festgestellt. Aus der erzielten Tatsache, dass die Gesamtmenge der beiden Elemente im ganzen Eiinhalt aber immer unverändert blieb, kann

Das Verhalten des Eisens und Kupfers bei der Bebrütung der Hühnereier.

Bebrütungs- dauer ↓ Einhalt	frisch		3 Tage		7 Tage		14 Tage		18 Tage		21 Tage	
	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg
Eigelb %*	0,048 77	1,505 92	0,049 79	1,449 88	0,043 69	1,290 79	0,033 53	1,214 74	0,016 26	0,505 31		
Eierklar %	0,014 23	0,138 8	0,014 22	0,114 7	0,012 20	0,105 6	0,006 10	0,049 3				
Embryo %					0,003 5	0,059 4	0,014 23	0,288 18	0,038 61	1,182 72	0,057 92	1,510 92
Allantoiswasser %					0,000 0	0,036 2	0,000 0	0,035 2	0,000 0	0,040 2		
Amnionwasser %					0,000 0	0,004 0	0,001 0	0,017 1	0,001 0	0,019 1		
Summe %	0,062 100	1,643 100	0,063 101	1,563 95	0,058 94	1,494 91	0,054 87	1,603 98	0,055 89	1,746 106	0,057 92	1,510 92

* Die Mengenverhältnisse sind auch in Prozentsatz der Gesamtmenge des Elements angegeben.

man wohl annehmen, dass im Stoffwechsel bei der Bebrütung das Kupfer oder Eisen in der Eierschale nicht in Betracht kommt.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Eier von einem gewissen Hühnerstamm wurden 3, 7, 14, 18 und 21 Tage lang bebrütet. Das Material wurde in Eigelb, Eierklar, Embryo, Amnion- und Allantoiswasser getrennt, verascht und mit verdünnter Salzsäurelösung in einem Messkolben aufgelöst.

Das Eisen wurde colorimetrisch als Sulfocyanat bestimmt. Die Bestimmung des Kupfers wurde auch colorimetrisch unter Zusatz von 10%iger Ammonrhodanidlösung, Pyridin und Chloroform ausgeführt, nachdem man die Salzsäurelösung mit Ammon versetzt und zentrifugiert hatte.

TABELLE I.
Eisen- und Kupfermenge in einem frischen Gesamtei.

Zahl	Gewicht(g)	Cu(mg)	Fe(mg)
1	50,1	0,059	1,925
1	52,5	0,072	1,443
1	54,6	0,043	1,420
1	43,8	0,061	1,566
1	38,5	0,048	1,602
1	53,2	0,104	1,889
1	48,1	0,051	1,723
1	43,2	0,052	1,446
Mittelwert	48,0	0,061	1,626

Die Kupfermenge im frischen Gesamtei stimmt gut mit dem Resultate von A. Loeschke überein.

TABELLE II.

Das Verhalten des Eisens und Kupfers im Eidotter bei der Bebrütung.
Die Zahlen geben die Menge der Elemente in einem Ei an.

Bebrütungs- dauer	frisch		3 Tage		7 Tage		14 Tage		18 Tage	
	Cu mg	Fe mg								
	0,042	1,235	0,058	1,582	0,046	1,098	0,026	1,356	0,017	0,388
	0,058	1,938	0,057	1,214	0,057	1,273	0,043	1,158	0,016	0,582
	0,048	1,449	0,050	1,258	0,039	1,019	0,027	1,255	0,019	0,375
	0,096	1,639	0,063	1,439	0,044	1,455	0,038	1,040	0,016	0,577
	0,052	1,378	0,033	1,713	0,041	1,465	0,036	1,263	0,014	0,681
	0,038	1,372	0,042	1,469	0,032	1,128	0,032	1,098	0,013	0,436
	0,055	1,524	0,053	1,705	0,043	1,022	0,028	1,097	0,019	0,587
	0,040	1,512	0,043	1,214	0,044	1,866	0,040	1,451	0,014	0,416
Mittelwert	0,048	1,505	0,049	1,449	0,043	1,290	0,033	1,214	0,016	0,505

TABELLE III.

Das Verhalten des Eisens und Kupfers in Eierklar bei der Bebrütung.

Bebrütungs-dauer	frisch		3 Tage		7 Tage		14 Tage	
	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg
	0,017	0,146	0,014	0,125	0,014	0,097	0,008	0,048
	0,014	0,155	0,018	0,094	0,013	0,113	0,005	0,042
	0,012	0,095	0,015	0,113	0,010	0,067	0,007	0,055
	0,018	0,138	0,010	0,129	0,012	0,095	0,004	0,038
	0,009	0,127	0,017	0,092	0,010	0,135	0,005	0,046
	0,015	0,203	0,014	0,125	0,013	0,126	0,006	0,029
	0,014	0,112	0,015	0,117	0,011	0,098	0,006	0,082
	0,013	0,129	0,017	0,120	0,014	0,112	0,007	0,052
Mittelwert	0,014	0,138	0,014	0,114	0,012	0,105	0,006	0,049

TABELLE IV.

Das Verhalten des Eisens und Kupfers im Embryo bei der Bebrütung.

Bebrütungs-dauer	7 Tage		14 Tage		18 Tage		21 Tage	
	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg	Cu mg	Fe mg
	0,003	0,074	0,015	0,388	0,036	1,482	0,063	1,270
	0,002	0,063	0,017	0,362	0,046	1,238	0,035	1,485
	0,002	0,087	0,014	0,384	0,033	1,086	0,053	1,546
	0,004	0,052	0,012	0,285	0,040	1,198	0,098	1,593
	0,002	0,066	0,013	0,375	0,039	1,263	0,065	1,304
	0,003	0,043	0,017	0,303	0,032	0,852	0,044	1,419
	0,006	0,054	0,014	0,238	0,049	1,042	0,048	1,698
	0,004	0,038	0,015	0,269	0,035	1,298	0,056	1,765
Mittelwert	0,003	0,059	0,014	0,288	0,038	1,182	0,057	1,510

TABELLE V.

Das Verhalten des Eisens und Kupfers in Allantois- und Amnionwasser bei der Bebrütung.

Bebrütungs- dauer	7 Tage			14 Tage			18 Tage		
	Zahl	Cu (mg)	Fe (mg)	Zahl	Cu (mg)	Fe (mg)	Zahl	Cu (mg)	Fe (mg)
Allantois- wasser	25	0,018	0,956	25	0,015	0,723	10	0,012	0,498
	30	0,017	1,057	30	0,022	1,240	25	0,018	0,920
Berechnet auf 1 Ei	1	0,0006	0,036	1	0,0006	0,035	1	0,0008	0,040
Amnion- wasser	30	0,019	0,167	25	0,029	0,561	23	0,020	0,341
	20	0,012	0,035	20	0,023	0,224	12	0,017	0,336
Berechnet auf 1 Ei	1	0,0006	0,004	1	0,001	0,017	1	0,001	0,019

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Mittelwert der Eisen- und Kupfermenge in einem frischen Gesamtei beträgt 1,643 mg (1,505 im Eigelb und 0,138 im Eierklar) und 0,062 mg (0,048 im Eigelb und 0,014 im Eierklar), (im Verhältnis von 27:1).

2. Das Verhältnis des Eisens im Eigelb und Eierklar zeigt 10:1 und dasjenige des Kupfers 3:1. Also ist eine verhältnismässig grössere Menge Kupfer in frischem Eierklar nachgewiesen.

3. Im Anfangsstadium der Bebrütung enthält das Embryo eine grössere Menge Kupfer, indem das Verhältnis Fe:Cu=20:1 beträgt.

4. Das Kupfer und Eisen in der Eierschale steht in keiner Beziehung mit der Menge derselben im Embryo bei der Bebrütung.

LITERATUR.

Elvehjem, C. A. und Hart, E. B. (1929): *J. Biol. Chem.*, **84**, 131.

Loeschke, A. (1931): *H.-S.*, **199**, 125.

McFarlane, W. D. und Milne, H. I. (1934): *J. Biol. Chem.*, **107**, 309.

Waddel, J., Steenboek, H. und Hart, E. B. (1929): *J. Biol. Chem.*,

84, 115.

ÜBER DIE ACYLASEWIRKUNG.

I. Mitteilung. Über das Verhalten des Pyridylglycins und der Derivate des Phenylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft.

VON

S. UTZINO, S. TSUNOO UND T. MORI.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät
Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 17. Juli 1937)

Nachdem S. Bondi und seine Mitarbeiter (1909, 1910) die Spaltung von Lipopeptiden durch Niere oder Leber und Smorodinzew (1922) diejenige von verschiedenen Benzoylaminosäuren durch Histozym, das zuerst von O. Schmiedeberg (1881) in Schweineniere und in Hundeleber aufgefunden wurde, festgestellt haben, wurde von H. Kimura (1928-9) weiter berichtet, dass Acylaminosäuren durch die verschiedenen Organauszüge nicht gleich stark hydrolysiert werden und die Hippursäurespaltung nicht parallel mit der der Acetyl- und Formylderivate verläuft, also dass durch Hunde-, Kaninchen- oder Schweinsenzyme Acetyl- und Formylaminosäuren leichter als Benzoylaminosäuren und Glycin- und Leucinderivate leichter als Phenylalaninderivate gespalten werden können. Nach ihm soll die stärkste Histozymwirkung in Schweinegeweben, dann in Kaninchen- und zuletzt in Hundegeweben gefunden werden. Betreffs der Spaltung der Benzoylaminosäuren hat H. Akizuki (1937) einen schlagenden Beweis für die Einheitlichkeit der drei Histozyne erbracht, indem er die Isolierung von Glycin-, Tyrosin- und Asparaginhistozym durch das Hitze- und Adsorptionsverfahren ausgeführt hat.

* Im weiteren Sinne des Histozyms möchten wir nach E. Abderhaldens Bezeichnung unter "Acylasewirkung" eine solche enzymatische Wirkung verstehen, welche unabhängig von der freien Aminogruppe die Acylaminoverkettung zu hydrolysiieren vermag.

Um nun zur Kenntnis der Beziehung zwischen der Konstitution der Acylglycinderivate und der Histozymwirkung im weiteren Sinne beizutragen, haben wir zuerst das Verhalten des Pyridyl- und des Phenylpropionylglycins unter Berücksichtigung der α - β ungesättigten sowie α - β substituierten Kette des letzteren studiert.

Die enzymatische Spaltung des Phenylpropionyl-, Phenyl- α - β -dibrompropionyl- und Phenyl- α -brom- β -oxypropionylglycins geschah in ähnlicher Weise wie die des Benzoylglycins, das am stärksten durch Niere und Leber des Schweins, schwächer aber durch die beiden Gewebe des Rindes und des Kaninchens hydrolysiert werden kann, wie schon von H. Kimura (1928-9) angegeben wurde. Das Zinnamoylglycin widersteht trotzdem den Enzymwirkungen besonders des Rindes sowie des Kaninchens gegenüber sehr stark. Zinnamoylglycin wurde am günstigsten bei PH 7,2-8,0 durch Schweineniere angegriffen. Durch Isolierung der Zimmtsäure haben wir die enzymatische Spaltung der Muttersäure festgestellt.

Was die Resistenz der α - β ungesättigten Säure anbetrifft, möchten wir in der zweiten Abhandlung dieser Arbeit nochmals darauf zurückkommen. α -Pyridinursäure verhält sich den Enzymwirkungen gegenüber fast ebenso wie Hippursäure, indem sie deutlich durch Nierengewebe des Schweins, Rinds oder Kaninchens, schwächer aber durch Kaninchenleber (Rindsleber negativ) angegriffen werden konnte. Sie wurde auch durch Pancreas sowie durch Milz des Schweins hydrolysiert.

EXPERIMENTELLER TEIL.

a) *Substrate:*

- 1) Hippursäure (E. Merck).
- 2) Zinnamoylglycin, Phenylpropionyl, Phenyl- α - β -dibrompropionyl-, und Phenyl- α -brom- β -oxypropionyl-glycin wurde nach Dakin (1908-9) bereitet.
- 3) Pyridinursäure stellte in dankenswerter Weise Herr Prof. Sendju zur Verfügung.

b) *Enzymlösung:* Ein Teil Gewebebrei der verschiedenen Tiere wurde mit dem dreifachen Volumen Glycerin-Wasser (1:1)

im Mörser gut zerrieben, durch ein feines Sieb koliert und dann im Eisschrank aufbewahrt.

c) *Versuchsansatz:* Bei dem Hauptversuche wurden 10 cem einer 0,1 Mol Substratlösung, in der berechneten Menge von Normalalkali aufgelöst, mit 25 cem Pufferlösung (Phosphat- oder Citratpuffer von pH 7,2) und 5 cem Enzymlösung versetzt und dann unter Toluolzusatz bei 37° digeriert.

Als Kontrolle wurde Enzymlösung ohne Substrat unter den gleichen Bedingungen wie beim Hauptversuch der Digestion unterworfen. Nach einer gewissen Zeit wurde die Aciditätszunahme in 5 cem Digestionslösung nach Sörensen oder die NH_2N -Zunahme in 1 cem Digestat nach Van Slyke bestimmt. In der Tabelle sind die Differenzen zwischen den beim Hauptversuch und den beim Kontrollversuch sowie sofort nach dem Versuch gefundenen Zahlen angegeben.

d) *Ergebnisse.*

Versuch 1. Spaltung der Hippursäure. (Tabelle I.)

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer (pH 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE I.

Aciditätszunahme in 5 cem Digestionslösung (cem 0,1 n-NaOH)

Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen	Hund
Niere	8	0,1	0,1	0,1	0
	24	1,3	0,2	0,1	0,3
	72	—	0,3	0,2	0,4
Leber	8	0,2	0,1	0,2	—
	24	1,1	0,1	0,1	—
	72	—	0,2	0,3	—
Pancreas	8	0	0	—	0
	24	0	0	—	0
	72	0	0	—	0
Milz	8	0	0	—	—
	24	0,2	0	—	—
	72	0,2	0	—	—
Darm	8	0	—	—	—
	24	0	—	—	—
	72	0	—	—	—

Versuch 2. Spaltung des Phenylpropionylglycins. (Tabelle II.)
 10 ccm Substratlösung (0,1 Mol) + 25 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung.

TABELLE II.

Aciditätszunahme in 5 ccm und NH₂-N Zunahme in 1 ccm Digestionslösung.

Gewebe	Std.	Schwein		Rind		Kaninchen	
		0,1 n-NaOH (cem)	NH ₂ -N (mg)	0,1 n-NaOH (cem)	NH ₂ -N (mg)	0,1 n-NaOH (cem)	NH ₂ -N (mg)
Niere	4	0,4	—	0	—	0	—
	8	0,5	—	0	—	0	—
	24	0,7	—	0,2	—	0,3	—
	48	0,8	—	0,4	—	0,5	—
	72	0,8	0,36	0,4	0,15	0,5	0,20
Leber	4	0,3	—	0	—	0	—
	8	0,4	—	0	—	0	—
	24	0,6	—	0	—	0,3	—
	48	0,6	—	0	—	0,4	—
	72	0,8	0,46	0	—	0,4	0,17
Panreas	4	0	—	0	—	—	—
	8	0	—	0	—	—	—
	24	0	—	0	—	—	—
	48	0	—	0	—	—	—
	72	0	—	0	—	—	—
Milz	4	0	—	0	—	—	—
	8	0	—	0	—	—	—
	24	0	—	0	—	—	—
	48	0	—	0	—	—	—
	72	0	0	0	—	—	—
Darm	4	0	—	—	—	—	—
	8	0	—	—	—	—	—
	24	0	—	—	—	—	—
	48	0	—	—	—	—	—
	72	0	—	—	—	—	—

Versuch 3. Spaltung des Phenyl- α - β -dibrompropionylglycins.

10 ccm Substratlösung (0,1 Mol) + 25 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung. (Tabelle III.)

TABELLE III.

NH ₂ -N Zunahme in 1 ccm Digestionslösung (mg)				
Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen
Niere	24	0,352	0,144	0,102
	72	0,517	0,293	0,192
Leber	24	0,012	0,023	0,013
	72	0,128	0,071	0,053
Pancreas	24	0	0	0
	72	0	0	—
Milz	24	0	0	—
	72	0	0	—

Versuch 4. Spaltung des Phenyl- α -brom- β -oxypropionylglycins.

10 ccm Substratlösung (0,1 Mol) + 25 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung. (Tabelle IV.)

TABELLE IV.

NH ₂ -N Zunahme in 1 ccm Digestionslösung (mg)				
Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen
Niere	24	0,179	0,091	0,077
	72	0,404	0,094	0,095
Leber	24	0,173	0,061	0,001
	72	0,217	0,094	0,053
Milz	24	-0,033	0,009	—
	72	-0,030	0,042	—
Pancreas	24	-0,002	0,021	—
	72	-0,003	0,047	—

Alle Phenylpropionylderivate wurden durch Niere und Leber (Schwein, Rind, Kaninchen) gespalten. Nur Phenylpropionylglycin zeigte Resistenz der Rindsleber gegenüber.

Versuch 5. Spaltung des Zinnamoylglycins bei verschiedenen PH-Werten durch Schweineniere. (Tabelle V.)

10 ccm Substratlösung (0,1 Mol) + 25 ccm Puffer + 5 ccm Enzymlösung.

TABELLE V.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)

Std. \ PH	6,0	6,4	7,0	7,2	7,4	8,0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
8	0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
24	0,2	0,4	0,4	0,6	0,5	0,7
42	0,4	0,7	0,7	1,0	0,9	0,9

Für die Spaltung des Zinnamoylglycins durch Schweineniere liegt der Optimalbereich auch bei PH 7,2-8,0.

Versuch 6. Spaltung des Zinnamoylglycins. (Tabelle VI.)

10 ccm Substratlösung (0,1 Mol) + 25 ccm Puffer (PH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung.

Die Säure widerstand den Enzymen sehr stark und wurde nur durch Niere und Leber des Schweins angegriffen.

Versuch 7. Spaltungsprodukte von Zinnamoylglycin durch Nierenenzym (Schwein).

4,8250 g. Zinnamoylglycin wurden in 60 ccm Pufferlösung (PH 7,2) aufgelöst und unter Zuastz von 20 ccm Nierenenzym und etwas Toluol bei 37° digeriert. Nach 172 Stunden wurde die Verdauungsflüssigkeit, nach Ansäuren mit Schwefelsäure, mit Äther gründlich ausgezogen. Die aus dem Ätherauszug ausgeschiedene Substanz schmilzt bei 130° (ca. 2,5546 g). Auf Grund dieses Schmelzpunktes sowie des Molekulargewichts ist die Säure sehr

TABELLE VI.

Aciditätszunahme in 5 ccm und NH₂-N Zunahme in 1 ccm Digestionslösung.

Gewebe	Std.	Schwein		Rind		Kaninchen	
		0,1 n-NaOH (ccm)	NH ₂ -N (mg)	0,1 n-NaOH (ccm)	NH ₂ -N (mg)	0,1 n-NaOH (ccm)	NH ₂ -N (mg)
Niere	4	0	—	0	—	0	—
	8	0,2	—	0	—	0	—
	24	0,6	—	0	—	0	—
	48	1,0	—	0	—	0	—
	72	—	0,578	0	0,020	0	0,040
Leber	4	0,2	—	0	0	0	—
	8	0,1	—	0	—	0	—
	24	0,2	—	0,1	—	0	—
	48	0,2	—	0,2	—	0	—
	72	0,3	0,116	0,1	0	0,1	0,010
Pancreas	4	0,2	—	0	—	—	—
	8	0,1	—	0,1	—	—	—
	24	0,1	—	0,1	—	—	—
	48	0,1	—	0,1	—	—	—
	72	0,2	0,050	0,1	0,010	—	—
Milz	4	0,1	—	—	—	—	—
	8	0,1	—	—	—	—	—
	24	0,1	—	—	—	—	—
	48	0,1	—	—	—	—	—
	72	0,1	0,020	—	—	—	—
Darm	4	0	—	—	—	—	—
	8	0	—	—	—	—	—
	24	0	—	—	—	—	—
	48	0	—	—	—	—	—
	72	0	0	—	—	—	—

wahrscheinlich als Zimtsäure anzunehmen.

0,4660 g Substanz: 29,3 ccm n/10 NaOH

Mol.-Gew. Ber. für C₉H₈O₂ 148

Gef. 159

Versuch 8. Spaltung der α -Pyridinursäure. (Tabelle VII.)
 10 ccm Substratlösung (0,05 Mol) + 25 ccm Puffer (Ph 7,2) + 5 ccm Enzymlösung.

TABELLE VII.

Aciditätszunahme in 5 ccm und $\text{NH}_2\text{-N}$ Zunahme in 1 ccm Digestionslösung.

Gewebe	Std.	Schwein		Rind		Kaninchen	
		0,1 n-NaOH (ccm)	$\text{NH}_2\text{-N}$ (mg)	0,1 n-NaOII (ccm)	$\text{NH}_2\text{-N}$ (mg)	0,1 n-NaOH (ccm)	$\text{NH}_2\text{-N}$ (mg)
Niere	4	0,2	—	0,3	—	0	—
	8	0,4	—	0,1	—	0	—
	24	0,6	—	—	—	0,3	—
	48	—	—	0,3	—	0,4	—
	72	—	0,271	0,3	0,071	0,5	0,194
Leber	4	0,1	—	0	—	0	—
	8	0,1	—	0	—	0	—
	24	0,1	—	0	—	0,1	—
	48	0,6	—	0	—	0,2	—
	72	0,6	0,300	0	0	0,3	0,058
Milz	4	0,1	—	0	—	—	—
	8	0,1	—	0	—	—	—
	24	0,1	—	0	—	—	—
	48	0,3	—	0	—	—	—
	72	0,3	0,090	0	—	—	—
Pancreas	4	0,1	—	0	—	—	—
	8	0,1	—	0	—	—	—
	24	0,2	—	0	—	—	—
	48	0,3	—	0	—	—	—
	72	0,3	0,064	0	—	—	—
Darm	4	0	—	0	—	—	—
	8	0	—	0	—	—	—
	24	0	—	0	—	—	—
	48	0	—	0	—	—	—
	72	0	—	0	—	—	—

Ein Pyridinursäure spaltendes Enzym findet sich beim Schwein in Niere, Leber Milz und Pancreas, beim Kaninchen in Niere und Leber und beim Rinde nur in Niere.

LITERATUR.

Akizuki, H. (1937): Diese Zeits., **25**, 43.
Bondi, S. (1909, 1910): Biochem. Z., **17**, 555; **23**, 511.
Dakin, D. (1908–1909): J. of Biolog. Chem., **5**, 303.
Kimura, H. (1928–1929): Diese Zeits., **10**, 207 u. 225.
Schmiedeberg, O. (1881): Arch. f. exper. Path. u. Pharm., **14**, 382.
Smorodinzew, A. (1922): H.-S., **124**, 123.

ÜBER DIE ACYLASEWIRKUNG.

II. Mitteilung. Über das Verhalten der Derivate des Furoyl- und Furfurpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft.

VON

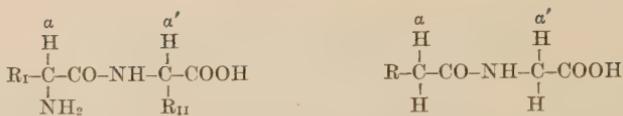
S. UTZINO, S. TSUNOO UND T. MORI.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 17. Juli 1937)

Im Anschluss an die Versuche betreffs der Acylasewirkung auf die Derivate des Phenylpropionylglycins (1937) haben wir weiter die vergleichende Untersuchung mit denjenigen des Furoyl- und Furfurpropionylglycins angestellt. Nach unseren Beobachtungen wurde Pyromykursäure (Furoylglycin) im allgemeinen nur durch Schweinsenzyme (Niere, Leber, Panreas und Milz) und durch Rindsniere gespalten, aber nicht durch Kaninchenezym, das die Pyridinursäure angreifen konnte. Oxymethylpyromykursäure zeigte auch ein starke Resistenz den Kaninchenenzymen gegenüber.

Im Gegensatz zu Furoylglycin (Pyromykursäure) konnte Furfurpropionylglycin durch Niere und Leber des Kaninchens angegriffen werden; die Resistenz der Furoylgruppe scheint also durch Verlängerung der Seitenkette herabgesetzt zu werden. Die Furfuracrylursäure verhält sich dem Enzym gegenüber so wie Pyromykursäure. Man kann hier sehr wahrscheinlich annehmen, dass der Wasserstoff am α -Kohlenstoffatom der Seitenkette eine Rolle spielen mag auch bei der Acylasewirkung besonders des Kaninchens, für die eine freie Aminogruppe nicht in Frage kommt, was auch bei dem Versuch mit Zinnamoylglycin (1937) der Fall war. Es lässt sich wohl an die Annahme Bergmans (1934) erinnern, dass die beiden am α - und α' -Kohlenstoffatom des Dipeptids getragenen Wasserstoffatome notwendig sind, wenn das Dipeptid durch die Dipeptidase gespalten werden soll.



Beim Fütterungsversuche von Furfurpropionylsäure beim Hunde entstand nach T. Sasaki (1910) Furfuracrylursäure als Hauptprodukt des Abbaus der Säure und ferner Pyromykursäure. Die enzymatische Spaltung dieser beiden Substanzen durch Hunde- und Katzenenzym wurde aber nicht sicher festgestellt.

Die Derivate mit Furan- sowie Pyridinring scheinen im allgemeinen durch Pancreasenzym des Schweins angreifbar zu sein. In Bezug auf die optimale Reaktion der Acylasewirkung verschiedener Herkunft auf Furoyl- und Furfuracrylglycin haben wir die deutliche Aciditätszunahme bei pH 6,6–8,0 beobachtet. Hier sei erwähnt, dass die Glycinderivate mit Furanring mehr oder weniger durch Schweinepancreas angegriffen sind, während diejenigen mit Phenylring dem Pancreasenzym sehr widerstehen, wie schon von S. Utzino (1928) dann H. Kimura (1928) und ferner von F. Itzioka (1936) gezeigt wurde. Als Beweis für die enzymatische Spaltung der Derivate haben wir Brenzsleimsäure aus der Digestionslösung mit Pyromykursäure und Furfuracrylsäure aus derjenigen mit Furfuracrylursäure isoliert.

EXPERIMENTELLER TEIL.

a) *Substrate:* 1) Pyromykursäure wurde nach T. Sasaki (1910) aus Brenzsleimsäurechlorid und Glykokoll in alkalischer Lösung hergestellt. 2) Furfuracrylursäure wurde aus dem Harn des Hundes isoliert, welcher mit Furfuracryl-paraoxyphenylharnstoff (Äthynal) gefüttert wurde (1935). Sie wurde aus heissem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. 3) Furfurpropionylglycin wurde nach T. Sasaki (1910) hergestellt, indem man die aus dem Harn dargestellte Furfuracrylursäure mit Natriumamalgam reduzierte. 4) Oxymethylpyromykursäure wurde nach J. Karashima (1927) aus Oxymethylbrenzsleimsäurechlorid und Glykokoll synthetisiert.

b) *Versuchsanordnung:* Die Versuche haben wir in der

Weise wie in der vorigen Abhandlung (1937) angestellt.

Enzymlösung: 1 Teil Gewebebrei + 3 Volumenteile Glycerin-Wasser (1:1) Versuchsansatz: 10 cem 0,1 Mol Substratlösung (als Na-Salz) + 25 cem Pufferlösung (P_{H_2} 7,2) + 5 cem Enzymlösung + 2 cem Toluol.

In der Tabelle sind die kontrollierten Zahlen der Aciditäts- oder NH_2 -N Zunahme angegeben.

c) *Ergebnisse:*

Versuch 1. Spaltung der Pyromykursäure bei verschiedenen Ph-Werten. (Tabelle I.)

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer (P_{H_2} 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE I.

Aciditätszunahme in 5 cem und NH_2 -N Zunahme in 1 cem Digestionslösung.

Ph	Std.	Schweineniere		Rindsniere	
		0,1 n-NaOH (cem)	NH_2 -N (mg)	0,1 n-NaOH (cem)	NH_2 -N (mg)
6,0	4	0,6	—	0,8	—
	8	0,6	0,238	1,35	—
	24	—	—	1,8	0,69
6,6	4	0,7	—	0,7	—
	8	0,7	0,243	1,7	—
	24	—	—	1,8	0,91
7,0	4	0,7	—	0,8	—
	8	0,7	0,238	1,2	—
	24	—	—	1,75	0,69
7,2	4	0,7	—	0,9	—
	8	0,8	0,254	1,6	—
	24	—	—	1,6	0,86
8,0	4	0,6	—	0,9	—
	8	0,6	0,249	1,7	—
	24	—	—	1,7	0,83

Die Pyromykursäure wurde deutlich bei pH 6,6–7,2 durch Schweineniere und bei pH 6,0–8,0 durch Rindsniere gespalten.

Versuch 2. Spaltung der Pyromykursäure. (Tabelle II.)

10 ccm Substratlösung 4,1 Mol) + 25 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung.

TABELLE II.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)							
Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen	Katze	Hund	Huhn
Niere	1	0,2	0,2	0	0	0	0
	4	0,6	0,9	0	0	0	0
	8	0,8	1,7	0	0	0	0
	24	—	1,7	0	0	0	0
	48	—	—	0	0	0	0
	72	—	—	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0
Leber	4	0,2	0	0	0	0	0
	8	0,9	0	0	0	0	0
	24	0,9	0	0	0	0	0
	48	—	0	0	0	0	0
	72	—	0	0	0	0	0
	1	0	0	—	—	0	—
	4	0	0	—	—	0	—
Milz	8	0	0	—	—	0	—
	24	0,4	0	—	—	0	—
	48	—	0	—	—	0	—
	72	—	0	—	—	0	—
	1	0,1	0,1	—	—	0	—
	4	0,1	0	—	—	0	—
	8	0,1	0	—	—	0	—
Pancreas	24	0,3	0,1	—	—	0	—
	48	0,4	0,1	—	—	0	—
	72	—	0,1	—	—	0	—
	1	0	—	—	—	—	—
	4	0	—	—	—	—	—
	8	0	—	—	—	—	—
	24	0	—	—	—	—	—
Darm	48	0	—	—	—	—	—
	72	0	—	—	—	—	—

Die Pyromykursäure war schwer angegrifbar. Sie wurde durch Schweinsenzyme (Niere, Leber, Pancreas und Milz) und nur durch Rindsniere hydrolysiert.

Versuch 3. Spaltungsprodukt von Pyromykursäure durch Nieren-enzym (Schwein).

1,8154 g Pyromykursäure, in 40 ccm Pufferlösung (Ph 7,2), wurden unter Zusatz von 5 ccm Nierenenzym und etwas Toluol bei 37° digeriert. Nach 4 Tagen wurde die mit Schwefelsäure ange-säuerte Versuchsflüssigkeit mit Äther ausgezogen. Beim Ab-

TABELLE III.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)

Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen	Katze	Hund
Niere	1	0,4	0,5	0	0	0
	4	0,6	0,7	0,1	0	0
	8	0,9	0,8	0,1	0	0
	24	0,9	0,8	0,4	0	0
	48	—	—	0,7	0	0
	72	—	—	—	0	0
Leber	1	0,2	0	0,1	0	0
	4	0,5	0	0,1	0	0
	8	0,9	0	0	0	0
	24	0,9	0	0,9	0	0
	48	—	0	1,2	0	0
	72	—	0	—	0	0
Milz	1	0,1	0	—	—	0
	4	0,4	0	—	—	0
	8	0,5	0	—	—	0
	24	0,8	0	—	—	0
	48	—	0	—	—	0
	72	—	0	—	—	0
Pancreas	1	0	0	—	—	0
	4	0,1	0	—	—	0
	8	0,1	0	—	—	0
	24	0,2	0	—	—	0
	48	0,5	0	—	—	0
	72	—	0	—	—	0
Darm	1	0	—	—	—	—
	4	0	—	—	—	—
	8	0	—	—	—	—
	24	0	—	—	—	—
	48	0	—	—	—	—
	72	0	—	—	—	—

dampfen des Äthers schied eine Substanz aus, die bei 132° schmolz. Der Schmelzpunkt sowie das Molekulargewicht stimmen gut mit denjenigen der Brenzschleimsäure überein.

0,2150 g Substanz: 18,7 cem 0,1 n-NaOH

Mol.-Gew. Ber. für $C_5H_4O_2$ 112

Gef. 115

Versuch 4. Spaltung des Furfurpropionylglycins. (Tabelle III.)

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer (pH 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

Hier ist zu erwähnen, dass ausser Schweineorganen sich die Spaltungsfähigkeit des Gewebes auch auf Niere und Leber des Kaninchens erstreckte. Katzen- und Hundeorgane konnten aber das Furfurpropionylglycin nicht zerlegen.

Versuch 5. Spaltung der Furfuraacrylursäure bei verschiedenen pH-Werten. (Tabelle IV.)

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE IV.

Aciditätszunahme in 5 cem und NH₂-N Zunahme in 1 cem Digestionslösung.

pH	Std.	Schweinsniere		Rindsniere	
		0,1 n-NaOH (cem)	NH ₂ -N (mg)	0,1 n-NaOH (cem)	NH ₂ -N (mg)
6,0	1	0,6	0,	0,5	—
	2	0,7	0,373	0,7	—
	3	0,9	—	0,6	0,35
6,6	1	0,6	—	0,5	—
	2	0,8	—	0,6	—
	3	0,9	0,381	0,6	0,40
7,0	1	0,5	—	0,7	—
	2	0,8	—	0,7	—
	3	0,8	0,458	0,8	0,44
7,2	1	0,9	—	0,8	—
	2	0,9	—	0,8	—
	3	0,9	0,401	0,8	0,45
8,0	1	0,4	—	0,6	—
	2	0,8	—	0,7	—
	3	0,8	0,401	0,7	0,44

Die Furfuraerylursäure wurde deutlich in einem weiteren Bereich von pH 6,0–8,0 durch Niere des Schweines sowie des Rindes hydrolysiert.

Versuch 6. Spaltung der Furfuraerylursäure. (Tabelle V.)

10 ccm Substratlösung (0,1 Mol) + 25 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung.

TABELLE V.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)							
Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen	Katze	Hund	Huhn
Niere	1	0,9	—	0	0	0	0
	4	0,9	—	0	0	0	0
	8	0,9	1,6	0	0	0	0
	24	1,0	—	0,1	0	0,1	0,1
	48	—	1,6	0,1	0	0,1	0,1
	72	—	—	0,1	0	0,1	0,1
Leber	1	0,3	0	0	0	0	0
	4	0,8	0	0	0	0	0
	8	0,8	0	0	0	0	0
	24	1,0	0	0	0	0	0
	48	—	0	0	0	0	0
	72	—	0	0	0	0	0
Milz	1	0	0	0	0	0	—
	4	0	0	0	0	0	—
	8	0,1	0	—	0	0	—
	24	0,6	0	—	0	0	—
	48	—	0	—	0	0	—
	72	—	0	—	0	0	—
Pancreas	1	0	0	0	0	0	—
	4	0	0	0	0	0	—
	8	0	0	—	0	0	—
	24	0	0	—	0	0	—
	48	0	0	—	0	0	—
	72	0	0	—	0	0	—
Darm	1	0	—	—	—	—	—
	4	0	—	—	—	—	—
	8	0	—	—	—	—	—
	24	0	—	—	—	—	—
	48	0	—	—	—	—	—
	72	0	—	—	—	—	—

Im Gegensatz zur Spaltung des Furfurpropionylglycins geschah die Hydrolyse der Furfuraerylursäure ähnlich wie

diejenige der Pyromykursäure, indem die Säure den Kaninchen-enzymen gegenüber widerstand. Hier sei erwähnt, dass sie auch nicht durch Katzen-, Hühner- oder Hundsenzyme angegriffen werden konnte.

Versuch 7. Spaltung der Furfuracrylursäure durch Schweineniere bei niedriger Temperatur (im Eisschrank 3°). (Tabelle VI.)

10 ccm Säurelösung (0,1 Mol) + 5 ccm Puffer (PH 7,2) + 1 ccm Enzym (a), + 1 ccm Enzym (erhitzt) (b), und + 1 ccm Wasser (c).

TABELLE VI.

NH ₂ -N Zunahme in 1 ccm Digestionslösung mg)			
Std.	a Enzymzusatz (im Eisschrank digeriert) (ca. 3°C)	b Enzymzusatz (im siedenden Wasserbade 30 Min. erhitzt)	c Wasserzusatz anstatt der Enzymlösung
24	0,214	0,01	-0,01
48	0,286	0	0

Beim Versuch 7 fällt es auf, dass die Furfuracrylursäure auch bei niedriger Temperatur durch Schweineniere gespalten werden kann. Es wäre von grösserem Interesse, die vergleichenden Versuche des diesbezüglichen Enzyms mit dem Histozym oder anderen Acylasenarten anzustellen und die weitere Trennung des Enzyms auszuführen.

Versuch 8. Spaltungsprodukt von Furfuracrylursäure durch Niere und Leberenzym (Schwein).

a) 7 tägige Digestionslösung von 1,0146 g. Furfuracrylursäure, die unter Zusatz von 40 ccm Pufferlösung (PH 7,2), 5 ccm Nierenenzym und etwas Toluol bei 37° aufbewahrt wurde, extrahierte man nach Ansäuren mit Schwefelsäure durch Äther aus. Die aus dem Ätherauszug abgeschiedene Substanz wurde aus Äther und Alcohol umkristallisiert (ca. 0,5182 g). Die Säure schmilzt bei 140°.

0,1784 g Substanz: 12,7 cem 0,1 n-NaOH

Ber. für $C_7H_5O_3$ 138

Mol.-Gew. Gef. 140

b) 1,0036 g Furfuraerylursäure wurden mit Leberenzym unter denselben Bedingungen wie oben digeriert und dann mit Äther behandelt. Ausbeute 0,7325 g. Der Schmelzpunkt (140°) sowie das Molekulargewicht sprechen für Furfuraerylsäure.

Versuch 9. Spaltung der Oxymethylpyromykursäure. (Tabelle VII.)

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer (pH 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE VII.

Aciditätszunahme in 5 cem und $NH_2\text{-N}$ Zunahme in 1 cem Digestionslösung.

Gewebe	Std.	Schwein		Rind	Kaninchen
		0,1 n-NaOH (cem)	$NH_2\text{-N}$ (mg)	0,1 n-NaOH (cem)	0,1 n-NaOH (cem)
Niere	4	0,1	—	0	0
	24	0,2	—	0	0
	48	0,3	0,065	0	0
	72	0,2	—	0,1	0
Leber	4	0	—	—	0
	24	0	—	—	0
	48	0	-0,006	—	0
	72	0,2	—	—	—

Oxymethylpyromykursäure scheint nur sehr schwach durch Schweineniere hydrolysiert zu werden. Sie zeigte also grosse Resistenz gegen die Enzymwirkung.

LITERATUR.

Bergmann, M. (1934): H.-S., 224, 11.

Itzioka, F. (1936): Diese Zeits., 24, 139.

Karashima, J. (1927): H.-S., 169, 278.

Kimura, H. (1928-9): Diese Zeits., 10, 207 und 225.

Sasaki, T. (1910): Biochem. Z., 25, 272.

Tsunoo, S. (1935): Diese Zeits., 21, 409.

Utzino, S. (1928): Diese Zeits., 9, 485.

Utzino, S., Tsunoo, S. u. Mori, T. (1937): Diese Zeits., 26, 443.

STUDIES ON THE CHANGES IN THE PHYSIOLOGICAL CONDITION OF THE NEW-BORN INFANT.

Report VI. On the carbohydrate metabolism.

BY

TADASHI SHOJI.

(From the Departments of Gynaecology and Medical Chemistry of the affiliated College of Medicine, Taihoku Imperial University, Japan.)

(Received for publication, July 17, 1937)

I. INTRODUCTION.

It is well known that the assimilation and dissimilation of carbohydrates and, therefore, the regulation of the blood sugar, is closely dependent upon the functions of the liver.

Regarding the studies on the blood sugar levels and on the carbohydrate metabolism in the new-born infant, there are already the investigations of Heynemann (1914), Feldmann (1921), Duzar and Hensch (1925), Strykowitsch (1927), Naito (1931), Winter (1933), but these were conducted with a different object from that which has been continually pursued by the writer in previous papers, and are insufficient for a proper study on the changes of the liver functions in the stage of the new-born.

In the succeeding pages are recorded the results of experiments on the fluctuations in the blood sugar level in young puppies of definite ages after birth, in those without any treatment and in those subjected to sugar loading tests, and an idea of the process of development of the liver function is presented.

The results showed that under fasting conditions, the blood sugar levels were low in the majority of puppies in the first week of life, but rose gradually after this and within 20 to 30 days a constant level was attained, of an average of 118 mg/dl. The carbohydrate metabolic functions of the liver were next examined from the viewpoints of the hyperglycaemic indices and the conti-

nuance of the hyperglycaemia after loading with *d*-galactose and *d*-glucose. The times necessary for the blood sugar to attain the highest levels were also minutely observed, and it was found that in the first 5 to 6 days after birth, the hepatic functions were poorly developed in the majority of cases. However, a marked improvement set in the group of 10 days old puppies, and the indications were definite that changes for the better were taking place with the age of the puppies, so that in the group of 30 days old puppies, the improvements were very marked.

II. EXPERIMENTAL.

I. Method.

The blood sugar levels were estimated by Hagedorn-Jensen's method, and the loading tests were conducted under fasting conditions, about 7 or 8 hours after the puppies were separated from their mothers. The bleedings were made from the jugular veins.

II. Fluctuations in the blood sugar levels of new-born infants under fasting conditions.

The blood sugar levels in human infants have been extensively studied in the past and the majority of reports show that they are lower in certain periods after birth (Lucas and Brown 1921, Schretter and Nevinny 1930, Nysten 1930, etc.). Again, it has been found that in animals (also in man), the liver glycogen is temporarily exhausted shortly after birth (Demant 1886, Ando 1918, Hotta 1924, Suzuki 1925, Maruyama 1927, Mitani 1936).

Previous to conducting the sugar loading tests, the blood sugar levels before the introduction of the tests materials were estimated, and their "fasting" figures noted. Further, in some cases the fasting blood sugar levels were estimated daily or on alternate days, and these results are indicated in Table I and Chart I.

From the above it will be seen that in the majority of cases, the blood sugar content is low in the first week of life; after this, however, higher figures are the rule.

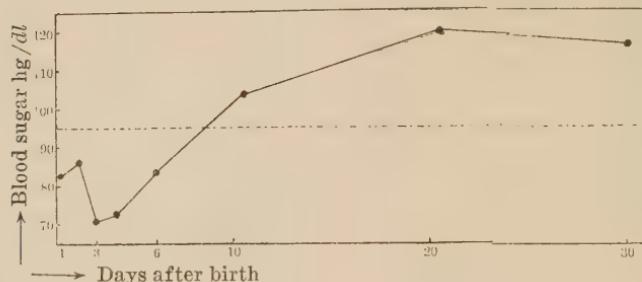
TABLE I.
Fasting blood sugar values, mg/dl

Exp. No.	Days after birth												18	19	20	21	23	28	29	30	32	36
	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	18	19	20	21	23	28	29	30	32	36	
A-group	1	88	77	63	73	88	71	86	88	109	121											
	2	70	63	52	52	81																
	3	98																				
	4	116	70	52	93	63																
	5	70	68	68	75	69																
	6	61	96	68	68	75																
	7	72	123	68	67	87																
	8			72	98	111																
	9				87	66																
	10					52																
	11																					
	12																					
	13																					
	14																					
	15																					
	16																					
B-group																						
Min.	61	70	52	52	63																	
Max.	116	123	93	103	123																	
Average	82	86	70	72	83																	
		84																				

Notes: "A" group animals: Examinations were made either daily or on alternate days. The animals were sometimes subjected to loading tests.

"B" group animals: The figures are of different animals. These were also subjected to loading tests.

Chart I.
Average "fasting" blood sugar levels in the first 30 days of life.



From Chart I it will be noted that the average figures show an increase from 82 to 86 mg/dl in the first to second days, but that they fall to 70 to 72 mg/dl on the third and fourth days. After this, however, a rise again sets in, so that from the fifth-eighth to about the tenth days the figures rose from 83 to 103 mg/dl, and on about the twentieth day the average level was 119 mg/dl, after which it remained almost stationary, the average for about the thirtieth day being 118 mg/dl.

The views of previous investigators on the relationship of the blood sugar values to the functional ability of the liver have varied considerably, but it is generally believed that it is difficult to diagnose the state of the liver by mere comparative studies in the blood sugar levels. In the succeeding paragraphs an attempt has therefore been made to arrive at some solution by sugar loading tests, and it was definitely established that a marked deficiency of the liver function corresponded with the hypoglycaemic state that is characteristic of the first week of life.

III. Sugar loading tests.

1. Experiments with *d*-galactose.

An 8% solution of galactose was introduced into the stomach by means of a Nelaton's catheter, the dose given being 5 ml. per kilogramm body weight. The effects on the blood sugar levels were then noted and compared with the levels previous to the administration of the sugar.

TABLE II.
Galactose loading tests in puppies up to 6 days old.

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount in ml. orally admd.	Normal sugar mg./dl	Sugar levels after:—					Hypergly- caemic indices	
					30'	1h	1h30'	2h	3h		
1	1	315	1.6	116	163	161	151	146	132	126	—
2	1	442	2.2	70	93	131	140	132	92	120	111
3	2	359	1.8	72	118	107	107	97	90	81	76
4	2	425	2.0	123	157	147	143	145	109	79	—
5	3	337	1.7	93	125	114	—	100	93	—	—
6	3	435	2.2	68	91	94	91	89	86	—	—
7	3	442	2.2	87	123	114	94	98	82	82	—
8	4	430	2.1	66	87	79	84	75	72	72	—
9	5	412	2.0	93	141	120	111	100	102	—	—
10	5	430	2.1	88	110	91	98	102	77	—	—
11	5	475	2.4	98	145	125	116	111	89	—	—
12	6	387	1.9	63	87	106	116	110	92	—	—
13	6	485	2.4	77	112	118	127	118	118	—	—
Actual averages				86	119	116	114	109	95	93	94
Average rate of rise in percentages				100	138	135	133	127	110	108	109
									40	40	1.49

a) In puppies up to 6 days old.

With this group, there were some cases, namely No. 4, 5, 7, 10 and 11, in which the blood sugar curves resembled that for the group of 20 days old puppies, but in the majority of cases, No. 1, 2, 3, 6, 8, 9, 12 and 13, the picture was different, for the hyperglycaemic indices were generally high in these cases and the highest levels after the administrations of the sugar were prolonged and were reached only after 30 minutes, one hour or one and half hours. Again the return to the previous blood sugar levels was slow and required over 3, 4, or 5 hours.

b) Group of 10 days old puppies.

The average for 8 cases showed that the maximum blood sugar level was reached in 30 mins, and the hyperglycaemic index was 1.31, which was lower than the previous set of animals. The hyperglycaemic state was also very much shortened. (See Chart II).

From the above it will be seen that in cases No. 14, 15, 17 and 19, the hyperglycaemic indices were relatively high but the fall to below the original values was rapid and the blood sugar curve resembled closely that for the group of 20 days old puppies. However, in cases No. 16, 18, 20 and 21, the hyperglycaemic indices were lower but the return to the previous sugar levels was extremely delayed and even after 3 or 4 hours the original values were not regained.

c) Group of 20 days old puppies.

Examinations of 6 cases showed that the highest sugar level was reached within 30 mins, and the hyperglycaemic index was lowest at 1.11 and highest at 1.44 with an average of 1.29. These figures were a little lower than that for the previous set of puppies, and the falls to below the original levels were more rapid; cases No. 20 and 22 required only one and a half hours and 2 hours. In the rest of the cases the levels after 3 hours were almost equivalent to the original.

d) Group of 30 days old puppies.

The highest levels in the blood sugar content were reached

TABLE III.
Galactose loading tests. (Group of 10 days old puppies.)

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount in ml. orally admd.	Normal sugar mg/dl	Sugar levels after:—				Absolute increase (max.)	Hypergly- caemic indices
					30'	1h	1h 30'	2h		
14	9	515	2.6	87	113	98	67	75	68	—
15	10	505	2.5	115	147	122	—	100	107	—
16	10	515	2.6	121	159	145	143	145	134	—
17	10	560	2.8	99	138	125	—	109	97	—
18	11	515	2.6	90	119	119	114	105	110	102
19	11	560	2.8	87	125	109	91	87	82	—
20	11	610	3.0	88	112	102	96	100	98	—
21	12	705	3.5	96	113	113	111	111	101	—
Actual averages				98	128	117	104	104	100	—
Average rate of rise in percentages				100	131	119	106	106	102	—
										30
										1.31

TABLE IV.
Galactose loading tests. (Group of 20 days old puppies.)

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount in ml. orally adm'd.	Sugar levels after:—				Absolute increase (max.)	Hyperglycaemic indices
				30'	1h	1h 30'	2h		
22	20	912	4.6	121	159	114	117	119	—
23	20	950	4.7	135	150	143	141	129	—
24	21	970	4.8	106	140	123	114	104	—
25	21	1170	5.8	116	137	123	121	115	—
26	22	990	4.9	118	170	150	138	134	—
27	22	1035	5.1	121	169	151	126	116	—
Actual averages				120	154	139	126	124	117
Average rate of rise in percentages				100	128	116	105	103	98
								35	129

TABLE V.
Galactose loading tests. (Group of 30 days old puppies.)

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount in ml. orally admd.	Normal sugar ng./ml	Sugar levels after:—			Absolute increase (max.)	Hypergly- caemic indices
					30'	1h	1h 30'	2h	
28	28	940	4.7	102	121	119	109	110	19
29	29	1100	5.5	120	133	122	115	117	13
30	29	1450	7.2	129	133	125	102	86	—
31	29	1560	7.8	129	156	120	107	77	—
32	30	1350	6.7	113	118	105	112	107	—
33	30	1620	8.1	111	121	93	93	102	—
34	35	1920	9.5	115	124	118	111	109	104
Actual averages				117	129	115	107	101	104
Average rate of rise in percentages				100	110	98	91	86	89
									1.11

within 30 minutes and the hyperglycaemic indices for the 7 cases examined, showed a minimum of 1.03, a maximum of 1.21 and an average of 1.11, figures markedly lower than those for the previous sets of younger puppies. Again, the hyperglycaemic state was much shorter and within one hour the levels for 4 of the cases were even lower than the original values, while in cases No. 30 and 31, the levels continued to fall even after this time. In the remaining 3 cases, the falls to below the original levels occurred within one and a half or 3 hours.

The average levels are represented by a curve in Chart II.

2. *Experiments with glucose.*

A sterile 10% solution of glucose was prepared and injected under the skin of the breast in doses of 4 ml. per kilogram body weight. The subsequent changes in the blood sugar levels were noted and compared with the original values.

a) *In puppies up to 6 days old.*

An examination of 7 cases showed that with the exception of one, the maximum levels were reached in 30 minutes or after, while the hyperglycaemic index was the highest for tests with glucose and showed an average of 1.79. The hyperglycaemic state was also extremely prolonged and in no cases were the original levels regained even after 3, 4 or 5 hours.

From the above it will be seen that in cases No. 2, 3 and 4 the maximum levels were extremely high (hyperglycaemic indices of 1.87-2.08), while in cases No. 1, 5, 6 and 7 the levels were slightly lower (hyperglycaemic indices of 1.47-1.57), but the hyperglycaemic state remained unchanged for a long time so that the curve obtained was rather flat. See Chart III.

b) *Group of 10 days old puppies.*

There were a few cases in which the maximum levels were attained within as early as 15 minutes, but the average for the 6 cases showed that 30 minutes had to elapse before the highest levels were reached. The average hyperglycaemic index for the

TABLE VI.
Glucose loading tests in puppies up to 6 days old.

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount injected in ml.	Normal sugar mg/dl	Sugar levels after:—					Absolute increase (max.)	Hypergly- caemic indices				
					15'	30'	1h	1h30'	2h	3h	4h				
1	1	415	1.7	98	130	144	128	128	—	119	—	105	46	1.47	
2	2	517	2.0	80	130	166	152	137	125	103	—	—	—	86	2.08
3	3	430	1.7	86	139	146	157	161	150	103	—	—	—	75	1.87
4	3	465	1.9	52	100	112	132	130	—	96	80	80	80	80	2.54
5	4	540	2.2	103	150	155	152	155	141	119	110	—	—	52	1.50
6	5	650	2.1	123	170	189	179	186	159	130	126	—	—	66	1.54
7	6	597	2.4	81	127	125	122	—	123	97	85	—	46	46	1.57
Actual averages				89	135	148	146	150	140	110	100	93	64	1.79	
Average rate of rise in percentages				100	152	166	164	169	157	124	112	104			

TABLE VII.
Glucose loading tests. (Group of 10 days old puppies.)

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount injected in ml.	Normal sugar mg./dl	Sugar levels after:—				Hypergly- caemic indices
					15'	30'	1h	1h 30'	
8	9	670	2.7	116	161	159	141	132	127
9	9	735	2.9	125	164	192	182	155	134
10	10	594	2.4	126	179	177	157	134	119
11	11	677	2.7	112	139	146	145	137	121
12	12	655	2.6	104	131	141	149	131	119
13	12	725	2.9	109	151	147	120	115	102
Actual averages				115	154	160	149	134	126
Average rate of rise in percentages				100	134	139	130	117	110
								48	110
									1.41

group showed a noticeable drop from the previous group of younger animals (1-6 days old puppies), to 1.41. The falls in the blood sugar levels in subsequent minutes were also rapid and within 2 or 3 hours, in more than half of the cases, the levels were lower than the original figures. (For the blood sugar curve refer to Chart III.)

c) Group of 20 days old puppies.

As in the previous set the maximum levels were attained within 15 minutes in some of the cases, but the averages still showed that 30 minutes were required. The average hyperglycaemic index for the group was 1.27 and was lower than in the previous set of animals, while the subsequent falls in the levels were rapid in cases No. 16, 17 and 18, but in others (cases No. 14 and 15) they were more gradual.

d) Group of 30 days old puppies.

The highest levels were reached within 15 minutes in 3 of the 4 cases examined, the average hyperglycaemic index for the period being 1.28. The falls in the levels in subsequent minutes were slow in cases No. 21 and 22, but in cases No. 19 and 20 they were extremely rapid. The curve of the averages for the four cases was small. See Chart III.

III. SUMMARY AND DISCUSSION.

In reviewing the results of these tests with galactose and glucose the general conclusions were as follows.

1) *Hyperglycaemic indices.* With the oral ingestion of 8% galactose in doses of 5 ml. per kilogram body weight, the average hyperglycaemic indices, as indicated in Table 10, fell with the age of the puppies. It will be seen that the fall from the group of 1-6 days old to that of 10-20 days old puppies was very marked. Further, from the latter group to that of 30 days old, it was even more so.

With subcutaneous injections of 10% glucose in doses of 4 ml. per kilogram body weight, the index for the group of 10 days old

TABLE VIII.
Glucose loading tests. (Group of 20 days old puppies)

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount injected in ml.	Normal sugar mg./dl	Sugar levels after:—				Hypergly- caemic indices
					15'	30'	1h	1h 30'	
14	18	1050	4.2	109	145	148	137	134	110
15	19	900	3.6	134	138	156	159	148	139
16	20	1100	4.4	128	153	155	119	—	110
17	21	980	3.9	132	162	150	130	123	144
18	22	1250	5.0	119	164	162	143	128	110
Actual averages				124	152	154	145	132	126
Average rate of rise in percentages				100	123	124	117	106	102
								97	98
								33	33
									1.27

TABLE IX.
Glucose loading tests. (Group of 30 days old puppies.)

Exp. No.	Days after birth	Body weight gm.	Amount injected in ml.	Normal sugar mg./dl	Sugar levels after:—				Hypergly- caemic indices
					15'	30'	1h	1h 30'	
19	29	1500	6.0	119	159	107	113	102	91
20	29	1550	6.2	123	145	131	120	125	111
21	30	1260	5.0	110	143	130	135	134	121
22	32	1120	4.5	101	128	132	128	123	119
Actual averages				113	144	125	124	121	111
Average rate of rise in percentages				100	127	111	110	107	98
								98	98
								32	32
									1.28

puppies was markedly lower than that for 1-6 days old. Again, the indices for the group of 20 and 30 days old puppies were still lower than that for the 10 days old group.

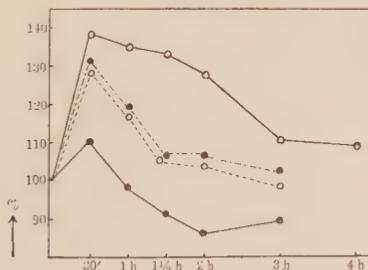
TABLE X.
Hyperglycaemic indices.

Day after birth	Tests with Galactose	Tests with Glucose
1-6	1.49	1.79
10	1.31	1.41
20	1.29	1.27
30	1.11	1.28

2) *Duration of the hyperglycaemic state.* In experiments with galactose, recovery to the original state was not seen within 3 hours in the majority of very young puppies of 1-6 days old. However, in the group of 10 days old puppies, half of those examined recovered within this period, while the levels for the rest were close to the original values. In the group of 20 days old puppies recovery was complete within 3 hours; there were cases, moreover, in which only 1 and a half hours or 2 hours were required. The times for the 30 days old group were still shorter.

In experiments with glucose there was no case in which a complete recovery occurred in puppies 1-6 days old, even after 3 or 4 hours, but in puppies 10 and 20 days old there were a few

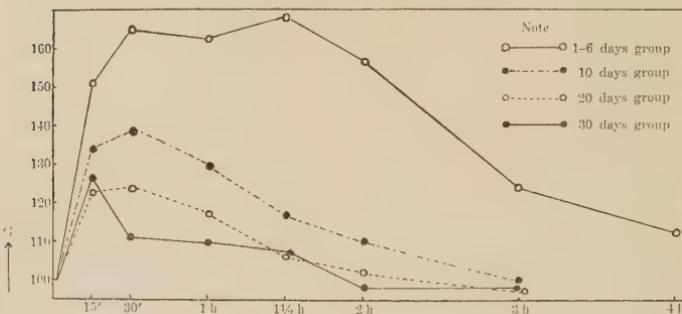
Chart II.



Showing rate of increase in blood sugar after administration
of galactose.

cases in which recovery took place within 2 or 3 hours. In puppies 30 days old, there were some in which recovery was complete as early as 30 or 60 minutes.

Chart III.
Showing rate of increase in blood sugar after administration of glucose.



3). *Times required for the attainment of the maximum hyperglycaemic state.* With oral administrations of galactose, the average figures showed that in every group the maximum levels were attained in 30 minutes. However, a closer examination revealed that in puppies 1-6 days old, there were 4 cases out of 13 in which the maximum levels were clearly delayed, to one or one and a half hours, while in the 10 days old group there were 2 cases out of 8, in which the levels for 30 and 60 minutes were equal. With older animals (20-30 days old) these irregularities were absent.

With subcutaneous injections of glucose, the maximum blood sugar levels were reached in 15 minutes in puppies 30 days old, but in younger animals the times were prolonged to 30 minutes and in those 1-6 days old the delay was still more marked.

Discussion—According to the usual conception of the relation between the blood sugar and liver function, the experiments reported here showed that the carbohydrate metabolic function of the liver was poorly developed shortly after birth, but with the increase in age of the animals this definitely improved. The re-

sults of both sets of experiments, with galactose and glucose, were closely alike for puppies from 1-6 days to 10 days old and demonstrated the extremely poor condition of the liver in these younger sets of animals. However, from the 10th to 20th days and from the 20th to 30th days, development, as indicated by the results with galactose and glucose loading tests, could not be considered as proceeding parallel. However, the courses of the average blood sugar curves showed that with the age of the puppies the rise became poorer, and the fall was more rapid. This rapid fall was very noticeable in dogs of 30 days old in both sets of experiments, and in some cases hypoglycaemia was even seen. This tendency is probably due to an overflow of insulin subsequent to a stimulation of the pancreas by the sugar absorbed into the blood.

In the experiments with galactose, it was seen that delay in the attainment of the maximum levels was marked in many of the younger puppies. This may be due to slow absorption by the intestinal mucosa, but this delay was also seen after subcutaneous injection of glucose, so that there may be other factors.

Some investigators (Staub 1921, Eisner and Foerster 1921, Miyoshi 1932) believe that alimentary hyperglycaemia is due not merely to the sugar actually absorbed, but also to glucose resulting from the breakdown of the liver glycogen by the stimulating action of the sugar administered. Our results may suggest that shortly after birth, there is a delay in the mobilisation of the liver glycogen in spite of stimulation by the sugar absorbed.

IV. CONCLUSION.

1. The fasting blood sugar in puppies 20-30 days old is high with an average of 118 mg/dl. In younger animals it becomes lower and in those in the first week of life, it is very low, especially the lowest is seen in puppies 3 or 4 days old.

2. After loading tests with *d*-galactose, the hyperglycaemic indices became higher the nearer the puppies are to birth, while the return to the original value or below it, was also more prolonged. The blood sugar curve, therefore, in puppies up to 5 or 6 days old was steep and large, while that for the group of 30

days old puppies was small. Again the times required to attain the maximum levels were longer in the younger animals.

3. After loading tests with *d*-glucose practically the same results were obtained.

4. From the above it was clear that in the first 5 to 6 days after birth, the carbohydrate metabolic functions of the liver were poorly developed. However, a marked improvement set in the group of 10 days old puppies, and the indications were definite that changes for the better were taking place with the age of the puppies, so that in the group of 30 days old puppies the improvements were very marked.

In conclusion, I wish to express my thanks to Profs. R. Hirohata and T. Ohga for their kind guidance and advice and for having read through what I have written. I am also indebted to Prof. K. Sakai and Dr. S. Yamasaki for their never failing encouragement.

REFERENCES.

Ando, K. (1918): *Kinki fujinka gakkai Zasshi*, **3**, 435.
Feldmann, P. (1921): *Zeitschr. f. Kinderheilk.*, **28**, 325.
Heynemann, Th. (1914): *Zeitschr. f. Geb. u. Gyn.*, **76**, 788.
Hotta, S. (1924): *Nippon fujinka gakkai Zasshi*, **19**, 893.
Maruyama, I. (1927): *Okayama igakkai Zasshi*, Nr. **451**, 1167.
Miyoshi, K. (1932): *Igaku Kenkyu*, **6**, 593.
Naito, K. (1931): *Nippon fujinka gakkai Zasshi*, **26**, 102.
Schretter, G. u. Nevinny, H. (1930): *Zeitschr. f. Geb. u. Gyn.*, **98**, 258.
Styrikowitsch, W. L. (1929): *Zeitschr. f. Kinderheilk.*, **47**, 517.
Suzuki, J. (1925): *Keioh igaku*, **5**, 167.
Winter, E. W. (1933): *Arch. f. Gyn.*, **154**, 354.

ÜBER DIE ACYLASEWIRKUNG.

III. Mitteilung. Über das Verhalten des Furoylisoserins und der Phenylhippursäure gegenüber Acylase- wirkung verschiedener Herkunft.

VON

S. UTZINO, S. TSUNOO, S. FUJITA UND T. MORI.

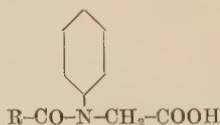
(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät
Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 21. August 1937)

In den vorigen Abhandlungen (1937) wurde das Verhalten der Glycinderivate mit Phenyl-, Furan- und Pyridinring den Enzymwirkungen verschiedener Herkunft gegenüber untersucht. Es wurde dabei darauf aufmerksam gemacht, dass das α -Wasserstoffatom der Propylkette auch bei der Acylasewirkung eine Rolle spielen dürfte. In vorliegender Arbeit wird einerseits das Verhalten der Acyl- β -aminosäure und anderseits ferner die Bedeutung des Iminowasserstoffes der Säureamidverkettung bei der Acylasewirkung studiert. Smorodinew (1922) hat schon festgestellt, dass β -Benzoylalanin und β -Benzoylaminobuttersäure durch das Histozym nicht hydrolysiert werden konnten. Auch den Dipeptidasewirkungen gegenüber widersteht das β -Aminosäurederivat im Allgemeinen stark, was schon von S. Utzino (1931) gezeigt wurde. Diese Tatsache haben wir hier weiter durch die starke Resistenz des *dl*-Furoylisoserins bei der Acylasewirkung (Schweineniere und Rindsniere) bestätigt. *dl*-Furoylalanin wurde leicht durch Schweinsenzyme (Niere, Pancreas und Milz) und auch durch Rinderenzyme (Niere und Leber) angegriffen.

Nach den erfolgreichen Beobachtungen von M. Bergmann (1934) muss der Stickstoff der Peptidbindung ein Wasserstoffatom tragen, wenn Dipeptidase die Peptidbindung spalten soll. Um die Frage, ob das Iminowasserstoffatom auch noch in Rechnung bei der Acylasewirkung, die nicht vom Vorhandensein einer freien Amino-

gruppe bedingt ist, zu stellen sein dürfte, zu erklären, haben wir hier Versuche mit Phenylhippursäure und Phenylpyromykursäure angestellt. Da diese beiden Derivate gegenüber der Niere und Leber des Kaninchens, des Rinds auch des Schweins sehr stark widerstehen, dürfen wir sehr wahrscheinlich schliessen, dass das Vorhandensein von Peptidwasserstoff notwendig ist, wenn Acylaminosäuren durch Acylasen gespalten werden sollen.



EXPERIMENTELLER TEIL.

A. Substrate.

1. *Furoylalanin*: Bei der Furoylierung des Alanins benutzte man das von E. Baum (1904) angegebene Verfahren. Furoylalanin bildet Tafeln von Schmp. 169° (unkorr.).

2. *Furoylisoserin*: 7 g Isoserin wurden in 93,1 ccm *n*-Natronlauge gelöst, und unter Eiskühlung und Schüttelung portionsweise mit 8 g Brenzschleimsäurechlorid und 105 ccm *n*-Natronlauge versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abfiltriert wurde, fügte man 110 ccm *n*-Salzsäure hinzu. Die angesäuerte Flüssigkeit wurde unter verminderter Druck eingeengt und mit Essigäther gründlich extrahiert. Der von Essigäther befreite sirupöse Rückstand wurde mit Benzol heiß digeriert, um die Brenzschleimsäure zu beseitigen. Im Eisschrank erstarrte der benzolunlösliche Teil zu einer krystallinischen Masse, die auf Tonplatte ausgestrichen, dann wieder mit heißem Benzol digeriert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde. Die Substanz schmilzt bei 125° (unkorr.) und reagiert gegen Lakmus sauer. Sie löst sich schwer in kaltem, leicht aber in heißem Wasser.

Analyse: 0,1759 g Subst.: 8,6 ccm *n*/10 H_2SO_4 (Kjeldahl)
 Ber. für $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_5\text{N}$ N = 7,04%
 Gef. N = 6,84%

3. *Phenylhippursäure*: Sie lässt sich direkt durch Benzoy-

lieren von Phenylaminoessigsäure nach der Fischerschen Methode erhalten (1904).

4. Phenylpyromykursäure wurde nach Erich Baum (1904) aus α -Phenylaminoessigsäure und Brenzschleimsäurechlorid in Natriumcarbonatlösung hergestellt.

B. Enzymlösung.

In der Weise wie in der vorigen Abhandlung beschrieben (1937), wurde ein Teil Gewebebrei (Schwein, Rind und Kaninchen) mit dem 3-fachen Volumen Glycerin-Wasser (1:1) gut zerrieben, kolliert und im Eisschrank aufbewahrt. 5 ccm dieser Lösung wurden für 35 ccm Substrat-Pufferlösung verwendet.

C. Versuchsansatz.

10 ccm einer 0,1–0,05 Mol Substratlösung (als Natriumsalz) wurden mit 25 ccm Pufferlösung (Phosphat- oder Citratpuffer) von pH 7,2 und 5 ccm Enzymlösung versetzt und dann unter Toluolzusatz bei 37° digeiert. Als Kontrollversuch wurde Enzym-Pufferlösung ohne Substrat unter den gleichen Bedingungen der Digestion unterworfen.

Die Aciditätszunahme in 5 ccm der Digestionslösung wurde nach Sörensen titriert. Die Zahlen in der Tabelle geben die unter Berücksichtigung der Acidität sofort nach der Ansatzvermischung sowie der der Kontrollversuche kontrollierte Aciditätszunahme an.

D. Ergebnisse.

Versuch 1. Spaltung des α -*dl*-Furoylalanins.

10 ccm Substratlösung (0,05 Mol) + 25 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Enzymlösung.

TABELLE I.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)			
Gewebe	Std.	Schwein	Rind
Niere	1	0,2	0,1
	4	0,3	0,1
	24	0,4	0,4
	48	0,4	0,4

Leber	1	—	0
	4	—	0,1
	24	—	0,2
	48	—	0,3
Pancreas	1	0,1	0
	4	0	0
	24	0,2	0
	48	0,3	0
Milz	1	0,1	—
	4	0,3	—
	24	0,4	—
	48	0,5	—

Versuch 2. Spaltung des *dl*-Furoylisoserins.

10 cem Substratlösung (0,05 Mol) + 25 cem Puffer (Ph 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE II.

Aciditätszunahme in 5 cem Digestionslösung (cem 0,1 n-NaOH)

Gewebe	Std.	Schwein	Rind
Niere	1	0	0
	4	0	0
	24	0	0
	48	0	0
Leber	1	—	0
	4	—	0
	24	—	0
	48	—	0
Pancreas	1	0	0
	4	0,1	0
	24	0,1	0
	48	0,1	0
Milz	1	0	—
	4	0	—
	24	0	—
	48	0	—

Wohl konnte die Gewebeacylase das Furoylderivat der α -Aminosäure hydrolyseren, aber das der β -Aminosäure nicht.

Versuch 3. Spaltung der Phenylpyromykursäure.

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer (Ph 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE III.

Aciditätszunahme in 5 cem Digestionslösung (cem 0,1 n-NaOH)

Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen
Niere	4	0	0	0
	28	0	0	0
	48	0	0	0
Leber	4	0	0	0
	28	0	0	0
	48	0	0	0

Versuch 4. Spaltung der Phenylhippursäure.

10 cem Substratlösung (0,1 Mol) + 25 cem Puffer (pH 7,2) + 5 cem Enzymlösung.

TABELLE IV.

Aciditätszunahme in 5 cem Digestionslösung (cem 0,1 n-NaOH)

Gewebe	Std.	Schwein	Rind	Kaninchen
Niere	4	0	0	0,1
	8	0	0	0,1
	24	0	0	0,1
	48	0	0	0,1
	72	0	0	0,1
Leber	4	0	0	0
	8	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
Pancreas	4	0	0	—
	8	0	0	—
	24	0	0	—
	48	0	0	—
	72	0	0	—
Milz	4	0	0	—
	8	0,1	0	—
	24	0	0	—
	48	0	0	—
	72	0	0	—

Weder Phenylpyromyksäure noch Phenylhippursäure wurden durch Gewebsacylase angegriffen.

LITERATUR.

Baum, E. (1904): Ber. chem. Ges., **37**, 2947.
Bergmann, M. (1934): H.-S., **224**, 11.
Smorodinzew, O. (1922): H.-S., **124**, 123.
Utzino, S. (1931): ebenda, **198**, 135.
Utzino, S. Tsunoo, S. und Mori, T. (1937): Diese Zeits., **26**, 439, 449.

ÜBER DIE ACYLASEWIRKUNG.

IV. Mitteilung. Über das Verhalten der Acyl-amino-oxypropansulfonsäure gegenüber Acylasewirkung.

VON

S. UTZINO, S. TSUNOO UND S. FUJITA.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 21. August 1937)

Das Trockenpräparat der Schweineniere spaltet nach Angaben von A. Smorodinzew (1922) die Glykocholsäure und die Taurocholsäure unter Abtrennung von Cholsäure.

Nach W. Grassmann und P. Basu (1931) wurden aber Tauro- und Glykocholsäure weder durch Glycerinauszüge aus Pankreas oder Dünndarmschleimhaut noch durch gereinigte Trockenpräparate der Pankreasproteinase oder der pankreatischen Carboxy-Polypeptidase zerlegt.

Dagegen fanden sie, übereinstimmend mit Smorodinzew, eine recht deutliche Spaltung durch Nierenextrakt, schlossen aus dem negativen Befund mit Pankreasauszügen und dem positiven Ergebnis mit Nierenextrakt eine Beteiligung der pankreatischen Carboxypolypeptidase aus und traten für eine Histozytmwirkung im Sinne von Smorodinzew ein. Weiter beobachteten sie die Spaltbarkeit durch Aspergillus oryzae, welcher auch ein Hippursäure spaltendes Enzym enthält.

Nach Grassmann und Basu wurde die Glykocholsäure deutlich zerlegt, die Taurocholsäure aber nur in der Fehlergrenze.

Es wäre von grossem Interesse weiter festzustellen, wie das Cholsäure- oder Benzoylderivat der 1-Amino-2-oxypropansulfonsäure sich den Gewebesauszügen gegenüber verhält. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass das Benzoylderivat dem Nieren- oder Leberauszuge des Schweins sehr stark widerstand, während die Hippursäure durch die Auszüge leicht angegriffen

werden konnte.

Hier sei noch erwähnt, dass das Cholsäurederivat der 1-Amino-2-oxy-propansulfonsäure (1935) auch nicht durch Nierenextrakt des Schweins angegriffen werden konnte. Bei der Nachprüfung der Ergebnisse von Grassmann und seinem Mitarbeiter (1931) haben wir die bedeutende Spaltung der Glykocholsäure durch Schweinsniere, aber nicht die der Taurocholsäure bestätigt. Was die Resistenz der Aminoxypropansulfonsäure anbetrifft, möchten wir wohl die β -Stellung der Aminogruppe (1937) einerseits und auch die Sulfonsäuregruppe anderseits in Betracht ziehen. Das Benzoylderivat scheint sogar auch eine hemmende Wirkung auf die Leberautolyse auszuüben.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Versuch 1. Spaltung der Benzoyl-1-amino-2-oxypropansulfonsäure durch Leber und Niere des Schweins.

Leber oder Niere des Schweins wurde mit Sand und dem gleichen Volumen Glyeerin-Wasser (1:1) gut zerrieben, mit Na_2CO_3 neutralisiert und im Eisschrank aufbewahrt. Beim Gebrauch wurde die zentrifugierte obere Schicht der Flüssigkeit abfiltriert.

Versuchsansatz:

- 10 ccm einer 1%igen Substratlösung (mit *n*-NaOH neutralisiert) + 30 ccm Puffer (pH 7,2) + 5 ccm Leberextrakt + 2 ccm Toluol.
- 10 ccm einer 2%igen Substratlösung + 20 ccm Puffer (pH 7,2) + 2 ccm Nierenextrakt + 2 ccm Toluol.

In der Tabelle sind die Differenzen zwischen der beim Haupt- und beim Kontrollversuche gefundenen Acidität, die sich auf die Titrationswerte nach Sörensen in 5 ccm Digestionslösung bezieht, angegeben.

TABELLE I.

Substrat	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)	
		a Leber	b Niere
Hippursäure	24	0,50	0,70
	48	0,90	—
	72	1,10	1,45
Benzoylaminooxy- propansulfonsäure	24	-0,15	0
	48	-0,40	0
	72	-0,50	0

Versuch 2. Spaltung der Glyko- sowie Taurocholsäure und des Cholsäurederivats der 1-Amino-2-oxypropansulfonsäure (1935) durch Schweineniere.

Versuchsansatz:

0,6 g Substrat (als Natriumsalz) + 10 ccm Puffer (Ph 7,2) + 2 ccm Mazerationssaft der Niere + 2 ccm Toluol.

TABELLE II.

Substrat	Zeit (Std.)	NH ₂ ·N-Zunahme in 1 ccm Digestionslösung (mg)
Glykocholsäure	24	0,06
	48	0,06
	168	0,10
Taurocholsäure	24	-0,03
	48	-0,01
	168	-0,02
Cholsäurederivat der Aminoxypropan- sulfonsäure	24	0
	48	-0,02
	168	0

Bei einem Versuchsansatz (1,5 g Substrat + 30 ccm Puffer (Ph 7,2) + 6 ccm Nierenmazeration + 2 ccm Toluol) haben wir die Acidität

tätszunahme nach Sörensen in 5 ccm Digestionslösung nach 24, 48 und 96 Stunden festgestellt wie folgt: im Glykocholsäureversuch 0,85, 1,00 und 1,05 ccm (0,1 *n*-NaOH) und im Taurocholsäureversuch respektive 0,0, 0,0 und 0,0 ccm.

LITERATUR.

Grassmann, W., Basu, P. (1931): H.-S., **198**, 247.
Smorodinzew, A. (1922): ebenda, **124**, 123.
Tsunoo, S. (1935): Ber. chem. Ges., **68**, 1334.
Utzino, S., Tsunoo, S., Fujita, S. und Mori, T. (1937); Diese Zeits., **26**, 477.

INDEX TO VOLUME 26.

A

ABE, Yosimi. The colorimetric micro-method of quantitative determination of desoxycholic and cholic acid in blood. 323.

Acetone, Experimental studies on the — forming function of the liver damaged with various methods. 19.

Acetone, Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the — forming function. 1.

Acetonkörperbildung, Über die Vorgänge der — in der Magenwand. 63.

Acyl-aminoxypropansulfonsäure, Über das Verhalten der — gegenüber Acylasewirkung. 483.

Acylasewirkung, Über die —. 439, 477, 483.

Adrenalin, Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des —s. 49.

AKASI, Syûzo. Verhalten des Octopins und seiner Isomere gegen Arginase. 129.

Aminosäurebildung, Über die — in der Milz. 307.

Aminosugar, Colorimetric analysis of —s in protein hydrolysates on the principle of Elson and Morgan. 223.

Ascitesflüssigkeit, Über die Hippur-säure in der —. 281.

Arginase, Studies über die —. 387. Arginase, Verhalten des Octopins und seiner Isomere gegen —. 129.

B

Biochemical studies on carbohydrates.

359.

Blood, On the influence of urethane anaesthesia upon the gaseous content of the —. 247.

Blood, The colorimetric micromethod of quantitative determination of desoxycholic and cholic acid in —. 323.

Blood gas studies performed with a new micro blood gas apparatus. 247.

C

Canavanin, Studies on diamino acid, —. 373.

Canavanin, The formation of desamino canavanin from —. 373.

Carbohydrate, Biochemical studies on —s. 359.

Carbohydrate metabolism, On the — —. 459.

Casein, Über die Dephosphorierung des —s durch die Phosphatase. 341.

Chenodesoxycholsäure, Über das Vorkommen der Cholsäure und gepaarter sowie ungepaarter — in Mugilgalle. 337.

Cholic acid, The colorimetric micro-method of quantitative determination of desoxycholic and — — in blood. 323.

Choladiensäure, Beiträge zur Kenntnis der —. 333.

Cholsäure, Über das Vorkommen der — und gepaarter sowie ungepaarter Chenodesoxycholsäure in Mugilgalle. 337.

Colorimetric analysis of aminosugars in protein hydrolysates on the principle of Elson and Morgan. 223.

Colorimetric micromethod, The —— of quantitative determination of desoxycholic and cholic acid in blood. 323.

D

Dehydrocholsäure, Über das Schicksal der —— im Kaninchenorganismus. 319.

Dehydrogenase, Über die —— von höheren Fettsäuren. 397.

Dephosphorierung, Über die —— des Caseins durch die Phosphatase. 341.

Desamino canavanin, The formation of —— —— from canavanin. 373.

Desoxycholic acid, The colorimetric micromethod of quantitative determination of —— —— and cholic acid in blood. 323.

Diamino acid, Studies on —— —— canavanin. 373.

Dünndarmproteolyse, Über den Einfluss der Galle auf die Pankreas- und die ——. 75.

E

Eisen, Über das Verhalten des Kupfers und ——s bei der Bebrütung der Hühnereier. 433.

Emulsion, Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der —— der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

Ernährung, Über den Einfluss der —— auf die Wirkung des Adrenalin. 49.

Extraktivstoffe, Über die —— aus

Krötenmuskel in der Leichzeit. 275.

F

Fat metabolism, A contribution to the —— ——. 1.

Fermente, Über die proteolytischen —— der Pankreasdrüse, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind. 81.

Fermente, Über die proteolytischen —— der Pankreasdrüse des Kaninchens. 37.

Fettsäure, Über die Dehydrogenase von höheren ——n. 397.

Fettsäureoxydation, Beiträge zur Kenntnis des —— im Tierkörper. 397.

Fettstoffwechsel, Über die Bedeutung der Schilddrüse im Zucker- und ——. 107.

Fischgalle, Beiträge zur Kenntnis der Gallensäuren von ——. 181.

FUJITA, S., UTZINO, S., TSUNOO, S. und T. MORI. Über die Acylasewirkung. III. Mitteilung. Über das Verhalten des Furoylisoserins und der Phenylhippursäure gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 477.

FUJITA, S., UTZINO, S. und S. FUJITA. Über die Acylasewirkung. IV. Mitteilung. Über das Verhalten der Acyl-aminoxypropansulfonsäure gegenüber Acylasewirkung. 483.

FUKUI, Tomoyasu und ISHIDA, Sukio. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Kaninchenorganismus. 319.

Furfurpropionylglycins, Über das Verhalten der Derivate der Furoyl- und —— gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft.

449.

Furoyl, Über das Verhalten der Derivate der — und Furfurylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 449.

Furoylisoserin, Über das Verhalten des —s und der Phenylhippuräure gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 477.

G

Galle, Über den Einfluss der — auf die Pankreas- und die Dünndarmproteolyse. 75.

Gallensäure, Beiträge zur Kenntnis der —n von Fischgalle. 181.

Gallensäure, Über die — der Kängurn-(*Macropus gigantens*) und Leoparden-Galle (*Felis Leopardus*). 327.

Gastric mucosa, On the so-called mucotinsulfuric acid (P. A. Levene) from ——. 233.

Gastric mucosa, Glycoproteins from ——. 239.

Glycerophosphate, Über Hydrolyse des α - und β -—. 137.

Glycoproteins from gastric mucosa. 239.

d-Glukosaminsäure, Über den Abbau der — durch Mikroorganismen und im Tierorganismus. 197.

H

Hernsäurebildung, Über die — in der Milz. 297.

HASHIMOTO, Kikuma. Über Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphates. 137.

HAYASHI, Hatiro u. IWASAKI, Takeshi. Über die Extraktivstoffe aus Krötenmuskel in der Laichzeit. 275.

HEIMA, Takashi and SODA, Katsuya.

Über die Hippursäure in der Ascitesflüssigkeit. 281.

Herkunft, Über das Verhalten der Derivate der Furoyl- und Furfurylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener —. 449.

Herkunft, Über das Verhalten des Furoylisoserins und der Phenylhippuräure gegenüber Acylasewirkung verschiedener —. 477.

Herkunft, Über das Verhalten des Pyridylglycins und der Derivate des Phenylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener —. 439.

Hippursäure, Über die — in der Ascitesflüssigkeit. 281.

HISAMURA, Humio. Biochemical studies on carbohydrates. XXIX. A few supplementary notes on the estimation of nonamino-sugars by the Dische, Tillmans, and Philippi methods. 359.

Hühneriere, Über das Verhalten des Kupfers und Eisens bei der Bebrütung der —. 433.

Human brain, Lipids analysis of the ——. 203.

Hunger, Bei —. 63.

Hydrolyse, Über — des α - und β -Glycerophosphates. 137.

Hypophyse, Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des Serums, des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der — auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

I

IMAIZUMI, Mitzimasa. Über das Ver-

halten des Kupfers und Eisens bei der Bebrütung der Hühnereier. 433.

IMAIZUMI, Mitzimasa. Über den Abbau der d-Glukosaminsäure durch Mikroorganismen, und im Tierorganismus. 197.

Indican, On the synthesis of —. 167.

Infant, Studies on the changes in the physiological condition of the new-born —. 167, 459.

Invertebrate, Chemical and immunological studies on muscle proteins of some —s. 87.

ISHIDA, Sukio und FUKUI, Tomoyasu. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Kaninchenorganismus. 319.

ISHIHARA, Tokuharu. Beiträge zur Kenntnis der Pentosurie bei experimentellem Stauungs-ikterus. 425.

ITO, N. und KOTAKE, Y. (jr.) Studien über den intermediären Stoffwechsel des Tryptophans. 161.

ITO, Ryoji and NAKAMURA, Takeo. Studies on Lipase. IV. Effects of reduction and oxidation on the reversible action of pancreatic lipase and pro-lipase. 187.

ITZIOKA, Fuyutaro. Über den Einfluss der Galle auf die Pankreas- und die Dünndarmproteolyse. 75.

ITZIOKA, Fuyutarо. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse, deren Ausführungs-gänge unterbunden worden sind. 81.

ITZIOKA, Fuyutarо. Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des Kaninchen. III. Mitteilung. Über die Aktivierung des Sekret-trypsinogens des Kaninchen. 37.

IWABUCHI, Takeo. Studien über die Arginase. II. 387.

IWASAKI, Takeshi u. HAYASHI, Hatiro. Über die Extraktivstoffe aus Krötenmuskel in der Leichzeit. 275.

K

Kaninchen, Über die proteolytischen Fermente der Pankreasdrüse des —s. 37.

Kaninchenorganismus, Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im —. 319.

KIMURA, Toshizo. Über die Gallensäure der Känguru-(*Macropus giganteus*) und Leopardenalle (*Felis Leopardus*). 327.

KITAGAWA, Matsunosuke and TSUKAMOTO, Jiro. Studies on diamino acid, canavanin. VI. The formation of desamino canavanin from canavanin. 373.

KIYOHARA, Kan-iti und IZAWA, Shozo. Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

KOTAKE, Y. (jr.) und N. ITO. Studien über den intermediären Stoffwechsel des Tryptophans. 161.

Kreuzversuch. 63.

Krötenmuskel, Über die Extraktivstoffe aus — in der Leichzeit. 275.

Kupfer, Über das Verhalten des —s und Eisens bei der Bebrütung der Hühnereier. 433.

L

LEONT'EV, I. and K. MARKOV. Chemical and immunological studies on muscle proteins of some invertebrates. 87.
 Lipase, Studies on —. 187.
 Lipids, analysis of the human brain. 203.
 Liver, Experimental studies on the acetone forming function of the — damaged with various methods. 19.

M

Magenwand, Über die Vorgänge der Acetonkörperbildung in der —. 63.
 MARKOV, K. and I. LEONT'EV. Chemical and immunological studies on muscle proteins of some invertebrates. 87.
 MASAMUNE, Hajime and NAGAZUMI, Yoshio. Colorimetric analysis of aminosugars in protein hydrolysates on the principle of Elson and Morgan. 223.
 Mikroorganismen, Über den Abbau der d-Glukosaminsäure durch — und im Tierorganismus. 197.
 Milz, Über den Stoffwechsel der stickstoffhaltigen Substanzen in der —. 285.
 Milz, Über die Aminosäurebildung in der —. 307.
 Milz, Über die Harnsäurebildung in der —. 297.
 Milzfunktion, Beiträge zum Studium der —. 285.
 MIYAZAKI, Masaki, A contribution to the fat metabolism. The second report. Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the acetone forming function. 1.

The third report. Experimental studies on the acetone forming function of the liver damaged with various methods. 19.
 MIYAZAKI, Shigeki. Beiträge zur Kenntnis der Choladiensäure. 333.
 MIYAZI, Shigeki u. KIMURA, Toshizo. Über das Vorkommen der Cholsäure und gepaarter sowie ungepaarter Chenodesoxycholsäure in Mugilgalle. 337.
 MORI, Chuzo. Über die Bedeutung der Schilddrüse bei Urikolyse. 97.
 MORI, Chuzo. Über die Bedeutung der Schilddrüse im Zucker- und Fettstoffwechsel. 107.
 MORI, T., UTZINO, S., TSUNOO, S. und FUJITA. Über die Acylasewirkung. III. Mitteilung. Über das Verhalten des Furoylisoserins und der Phenylhippursäure gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 477.
 MORI, T., UTZINO, S. und S. TSUNOO. Über die Acylasewirkung. I. Mitteilung. Über das Verhalten des Pyridylglycins und der Derivate des Phenylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 439.
 II. Mitteilung. Über das Verhalten der Derivate der Furoyl- und Furfurpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 449.
 MORIMOTO, Kazuyoshi. Über die Phenolsulfatase. 259.
 Mucoitinsulfuric acid, On the so-called — (P. A. Levene) from gastric mucosa. 233.
 Mugilgalle, Über das Vorkommen der Cholsäure und gepaarter sowie ungepaarter Chenodesoxycholsäure im —. 337.

Muscle protein, Chemical and immunological studies on ——s of some invertebrates. 87.

N

NAKAMURA, Takeo and ITOH, Ryoji. Studies on Lipase. IV. Effects of reduction and oxidation on the reversible action of pancreatic lipase and pro-lipase. 187.

Nonamino-sugar, A few supplementary notes on the estimation of ——s by the Dische, Tillmans, and Philippi methods. 359.

Nutrition, Experimental studies on the influence of various kinds of —— upon the acetone forming function. 1.

O

Octopin, Verhalten des ——s und seiner Isomere gegen Arginase. 129.

Ovarium, Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes Plazenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasreaktion des ——s des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

Oxydasreaktion, Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Planzenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf —— des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

OZAKI, Genei. Glycoproteins from gastric mucosa. 239.

OZAKI, Genei. On the so-called mucoitinsulfuric acid (P. A.

Levene) from gastric mucosa. 233.

P

Pancreatic lipase, Effects of reduction and oxidation on the reversible action of —— and pro-lipase. 187.

Pankreas, Über den Einfluss der Galle auf die —— und die Dünndarmproteolyse. 75.

Pankreasdrüse, Über die proteolytischen Fermente der ——, deren Ausführungsgänge unterbunden worden sind. 81.

Pankreasdrüse, Über die proteolytischen Fermente der —— des Kaninchens. 37.

Pentosurie, Beiträge zur Kenntnis der —— bei experimentellem Stauungskterus. 425.

Phenolsulfatase, Über die ——. 259.

Phenylhippursäure, Über das Verhalten des Furoylisoserins und der —— gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 477.

Phenylpropionylglycin, Über das Verhalten des Pyridylglycins und der Derivate des —— gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 439.

Phosphatase, Über die Dephosphorylierung des Caseins durch die Phosphatase. 341.

Plazenta, Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Planzenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasreaktion des Ovariums, des Uterus und einiger Organe. 211.

Prolan, Über die Einflüsse des Schwan-

gerenharns, des Extraktes der Plazenta, des —s des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

Pro-Lipase, Effects of reduction and oxidation on the reversible action of pancreatic lipase and —. 187.

Protein, colorimetric analysis of amino-sugars in — hydrolysates on the principle of Elson and Morgan. 223.

Pyridylglycin, Über das Verhalten des —s und der Derivate des Phenyl-propionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 439.

S

SADAMITSU, Rizo. Über die Dephosphorierung des Caseins durch die Phosphatase. 341.

SAITO, Koichiro and SHUEH, Chin Kai. On the influence of urethane anaesthesia upon the gaseous content of the blood. (Blood gas studies performed with a new micro blood gas apparatus III). 247.

Schicksal, Über das — der Dehydrocholsäure im Kaninchenorganismus. 319.

Schilddrüse, Über die Bedeutung der — bei Urikolyse. 97.

Schilddrüse, Über die Bedeutung der — im Zucker- und Fettstoffwechsel. 107.

Schwangerenharn, Über die Einflüsse des —s des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kanin-

chens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

Sekret-trypsinogen, Über die Aktivierung des —s des Kaninchens. 37.

Serum, Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des —s des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe. 211.

SHIMADA, Toshio. Beiträge zur Kenntnis der Gallensäuren von Fischgalle. Maguro-Fisch (*Thynnus thynnus*) und Ishinagi-Fisch (*Stereolepis ishinagi*). 181.

SHOJI, Tadashi. Studies on the changes in the physiological condition of the new-born infant. V. On the synthesis of indican. 167.

SHOJI, Tadashi. Studies on the changes in the physiological condition of the new-born infant. Report VI. On the carbohydrate metabolism. 459.

SHUEH, Chin Kai and SAITO, Koichiro. On the influence of urethane anaesthesia upon the gaseous content of the blood. (Blood gas studies performed with a new micro blood gas apparatus. III). 247.

SODA, Katsuya. Beiträge zum Studium der Milzfunktion. I. Über den Stoffwechsel der stickstoffhaltigen Substanzen in der Milz. 285.

II. Über die Harnsäurebildung in der Milz. 297.

III. Über die Aminosäurebildung in der Milz. 307.

SODA, Katsuya and HEIMA, Takashi.
Über die Hippursäure in der
Ascitesflüssigkeit. 281.

Stauungskiterus, Beiträge zur Kenntnis
der Pentosurie bei experimentel-
lem —. 425.

Stoffwechsel, Studien über den inter-
mediären — des Tryptophans.
161.

Stoffwechsel, Über den — der stick-
stoffhaltigen Substanzen in der
Milz. 285.

T

Tierkörper, Beiträge zur Kenntnis der
Fettsäureoxydation im —. 397.

Tierorganismus, Über den Abbau der
d-Glukosaminsäure durch Mikro-
organismen und im —. 197.

Tryptophan, Studien über den inter-
mediären Stoffwechsel des —s.
161.

TSUNOO, S., UTZINO, S., MORI, T. und
FUJITA. Über die Acylasewirkung.
III. Mitteilung. Über das Verhalten
des Furoylisoserins und der
Phenylhippursäure gegenüber
Acylasewirkung verschiedener
Herkunft. 477.

TSUNOO, S., UTZINO, S. und S. FUJITA.
Über die Acylasewirkung. IV.
Mitteilung. Über das Verhalten
der Acyl-aminoxypropansulfon-
säure gegenüber Acylasewirkung.
483.

TSUNOO, S., UTZINO, S. und T. MORI.
Über die Acylasewirkung. I. Mit-
teilung. Über das Verhalten des
Pyridylglycins und der Derivate
des Phenylpropionylglycins gegen-
über Acylasewirkung verschiedener
Herkunft. 439.

II. Mitteilung. Über das Verhalten
der Derivate der Furoyl- und

Furfurpropionylglycins gegenüber
Acylasewirkung verschiedener
Herkunft. 449.

TSURU, Nagao. Über die Vorgänge
der Acetonkörperbildung in der
Magenwand.

II. Mitteilung. Bei Hunger.

III. Mitteilung. Kreuzversuch. 63.

U

Urethane, On the influence of —
anaesthesia upon the gaseous con-
tent of the blood. 247.

Urikolyse, Über die Bedeutung der
Schilddrüse bei —. 97.

Uterus, Über die Einflüsse des Schwan-
gerenharns, des Extraktes der
Plazenta, des Prolans, des Serums
des schwangeren Kaninchens und
der Emulsion der Hypophyse auf
Oxydasereaktion des Ovariums,
des — und einiger anderer
Organe. 211.

UTZINO, S., S. TSUNOO, T. MORI und
FUJITA. Über die Acylasewirkung.
III. Mitteilung. Über das Ver-
halten des Furoylisoserins und der
Phenylhippursäure gegenüber
Acylasewirkung verschiedener
Herkunft. 477.

UTZINO, S., S. TSUNOO und T. MORI.
Über die Acylasewirkung. I. Mit-
teilung. Über das Verhalten der
Verhalten der Acyl-aminoxypro-
pansulfonsäure Acylasewirkung.
483.

UTZINO, S., TSUNOO und T. MORI. Über
die Acylasewirkung. I. Mitteilung.
Über das Verhalten des Pyridyl-
glycins und der Derivate des
Phenylpropionylglycins gegenüber
Acylasewirkung verschiedener
Herkunft. 439.

II. Mitteilung. Über das Verhal-

ten der Derivate der Furoyl- und Furfurpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft. 449.

Y

YASUDA, Morio. Lipids analysis of the human brain. 203.

YOSHIO, Keizo. Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des

Adrenalins. II. Mitteilung. 49.
YOSII, Syunitirô. Beiträge zur Kenntnis der Fettsäureoxydation im Tierkörper. A. Über die Dehydrogenase von höheren Fettsäuren. 397.

Z

Zucker, Über die Bedeutung der Schilddrüse im — und Fettstoffwechsel. 107.

ANNOTATIONES
ZOOLOGICAE JAPONENSES

PUBLISHED BY

THE TOKYO ZOOLOGICAL SOCIETY,
COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: \$ 6.00 per volume.

Journal of the Chemical
Society of Japan
(Japanese)

Annual Subscription: \$ 4.00

Bulletin of the Chemical
Society of Japan

(English, French or German)

Annual Subscription: \$ 2.00

PUBLISHED BY

THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN
c/o Faculty of Science, Tokyo Imperial University.

ACTA PHYTOCHIMICA

PUBLISHED BY

THE IWATA INSTITUTE OF PLANT BIOCHEMISTRY.

Subscription Price: \$ 5.00 per volume.

(Remittance should be sent to Maruzen & Co. Ltd.,
14 Tori Sanchome, Nihonbashi, Tokyo)

外字生化學雜誌第二十六卷第三號

東京牛込區市谷加賀町一丁目十一番地
株式會社 柿内三郎

東京市神田區美土代町十六番地
印刷者 島連太郎

昭和十二年十一月廿五日印刷 (定價每一卷
昭和十二年十一月三十日發行 內地金拾円)

東京市神田區美土代町十六番地
印刷所 三秀舎

CONTENTS

	Page
SADAMITSU, Rizo. Über die Dephosphorierung des Caseins durch die Phosphatase	341
HISAMURA, Humio. Biochemical studies on carbohydrates. XXIX. A few supplementary notes on the estimation of nonamino-sugars by the Dische, Tillmans, and Philippi methods	359
KITAGAWA, Matsunosuke and TSUKAMOTO, Jiro. Studies on diamino acid, canavanin. VI. The formation of desamino canavanin from canavanin	373
IWABUCHI, Takeo. Studien über die Arginase. II	387
YOSII, Syunitirô. Beiträge zur Kenntnis der Fettsäureoxydation im Tierkörper	397
ISHIHARA, Tokuharu. Beiträge zur Kenntnis der Pentosurie bei experimentellem Stauungskterus	425
IMAIZUMI, Mitzimasa. Über das Verhalten des Kupfers und Eisens bei der Bebrütung der Hühnereier	433
UTZINO, S., S. TSUNOO und T. MORI. Über die Acylasewirkung. I. Mitteilung. Über das Verhalten des Pyridylglycins und der Derivate des Phenylpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft	439
II. Mitteilung. Über das Verhalten der Derivate der Furoyl- und Furfurpropionylglycins gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft	449
SHOJI, Tadashi. Studies on the changes in the physiological condition of the new-born infant. Report VI. On the carbohydrate metabolism	459
UTZINO, S., S. TSUNOO, T. MORI und S. FUJITA. Über die Acylasewirkung. III. Mitteilung. Über das Verhalten des Furolylserins und der Phenylhippursäure gegenüber Acylasewirkung verschiedener Herkunft	47
UTZINO, S., S. TSUNOO und S. FUJITA. Über die Acylasewirkung. IV. Mitteilung. Über das Verhalten der Acyl-aminoxypropansulfonsäure gegenüber Acylasewirkung	483

The Journal of Biochemistry is designed for the prompt publication of original investigation in biochemistry. It is issued bimonthly. Each volume will contain about 500 pages. Contributions should be sent to the editor of *The Journal of Biochemistry*, the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University, Tokyo. The papers should be limited to twenty printed pages, unless specially arranged. Authors receive 30 reprints of their papers free of charges, additional copies may be obtained at

The subscription price is per volume \$5,50. Remittances should be made by draft or cheque either on Tokyo or on New York, or by postal money order, payable to *The Journal of Biochemistry*, 11 Itchom Kagocho, Ushigome, Tokyo.